GABRIELA RODRIGUES

**Eletroquimioterapia para tratamento de câncer –
desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com
camundongos portadores de melanoma B16F10**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2014

GABRIELA RODRIGUES

**Eletroquimioterapia para tratamento de câncer –
desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos
portadores de melanoma B16F10**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: João Dias de Toledo Arruda Neto

Colaboradores: Elizabeth Cristina Pérez
Hurtado

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rodrigues, Gabriela.

Eletroquimioterapia para tratamento de câncer - desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10 / Gabriela Rodrigues. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda-Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Oncologia.

Versão do título para o inglês: Electrochemotherapy for cancer treatment - development and evaluation case study in mice with melanoma B16F10

1. Câncer 2. Neoplasia 3. Eletroquimioterapia 4. Bleomicina 5. Eletroporação 6. Melanoma I. Arruda-Neto, Prof. Dr. João Dias de Toledo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0182/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Gabriela Rodrigues.

Título da Tese: Eletroquimioterapia para tratamento de câncer - desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10.

Orientador(a): Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda-Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 155/13 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Estudo da evolução tumoral de melanoma em camundongos tratados com eletroquimioterapia associada a radioterapia com cobalt - 60”, Espécie utilizada: “Camundongos” Número de animais utilizados: “Oitenta” sob a responsabilidade de “GABRIELA RODRIGUES E ELISABETH CRISTINA PÉRES HURTADO”, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 18 dias do mês de setembro de 2013.

Hailey Barros F. Gonçalves
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa da UNIP

À minha avó pelo incentivo,
carinho, apoio e dedicação constante,
sempre me lembrarei dos seus
ensinamentos.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador João Dias de Toledo Arruda-Neto pela oportunidade e pelo auxílio.

À minha colaboradora Elizabeth Cristina Pérez Hurtado pela grande ajuda e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos técnicos do biotério da Universidade Paulista pelo auxílio e convivência.

Ao Departamento de Pós-Graduação da Universidade Paulista e ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo auxílio e parceria.

À Secretaria de Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas e à Secretaria do Instituto de Física pelo auxílio

À Tamy pelo companheirismo, apoio e inestimável paciência.

À Lilian pelo apoio, dedicação e amizade.

Aos meus pais pelo incentivo, sem eles não poderia estar aqui.

Aos meus irmãos e cunhada pela compreensão e ajuda.

Aos amigos e professores pela dedicação, convívio e amizade.

Aos meus filhos de quatro patas que estiveram sempre comigo, me dando apoio e carinho.

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."
Martin Luther King

RESUMO

RODRIGUES, G. **Eletroquimioterapia para tratamento de câncer – desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10 2014.** 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Neoplasias são proliferações anormais, excessivas e autônomas do tecido. O melanoma é uma neoplasia maligna de grande pleomorfismo, com variações nos padrões de crescimento e taxa de resposta à quimioterapia relativamente baixa. A aplicação de pulsos elétricos aumenta a permeabilidade da membrana celular, facilitando a passagem de drogas quimioterápicas, aumentando assim sua eficácia no tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do melanoma ao tratamento com eletroquimioterapia. No Instituto de Física da Universidade de São Paulo foi desenvolvido um aparelho eletroporador, possibilitando a aplicação de 8 pulsos elétricos de 1000V/cm com duração de 100 μ s e frequência de 1 Hz e 5 kHz.

Foi realizado um estudo experimental com 80 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 separados em 16 grupos com 5 animais cada, divididos em grupo tratado com uma aplicação de Bleomicina intratumoral, tratado com uma aplicação de eletroporação, tratado com uma aplicação de eletroporação associada ao uso do quimioterápico Bleomicina (eletroquimioterapia), tratado com duas aplicações de eletroporação com intervalo de três dias entre as aplicações, tratado com duas aplicações de Bleomicina, tratado com duas aplicações de eletroquimioterapia e seus respectivos controles. As células de melanoma B16 foram inoculadas no dorso de camundongos e o crescimento da massa tumoral foi medido diariamente. Avaliou-se a histologia tumoral, o número de mitoses, a contagem de microvasos pelo marcador 1A4 e o número de mastócitos através da marcação com anticorpo Triptase. Os animais do grupo tratado com uma aplicação de eletroquimioterapia apresentaram média de sobrevida cerca de 2,3 vezes maior que os animais do grupo controle. Nos animais tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia observou-se remissão total do tumor em 60% dos casos e remissão parcial nos demais, com retorno do crescimento após 12 dias de tratamento. Esse grupo apresentou sobrevida 4,5 vezes maior que o controle. Não foi observada diferença na sobrevida dos grupos tratados com uma e duas aplicações de eletroporação e Bleomicina com os respectivos controles. Observou-se diminuição do número de mitoses nos grupos tratados com uma e duas aplicações de eletroquimioterapia e redução do número de mastócitos nos grupos tratados com duas aplicações de eletroporação e eletroquimioterapia. Esses resultados indicam a eficácia do aparelho (desenvolvido pelo grupo) e do tratamento estudado.

Palavras-chave: Câncer. Quimioterapia. Eletroporação. Bleomicina.

ABSTRACT

RODRIGUES, G. **Electrochemotherapy for cancer treatment - Development and Evaluation Case Study in Mice with melanoma B16F10**. 110 p. Thesis (PhD in biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Neoplasms represent abnormal, excessive, intentional and autonomous proliferations of tissue. Melanoma is a malignant neoplasm with huge pleomorphism with variations in the standards of growth, as well as in the relatively low response rate to chemotherapy. The use of electric pulses increases the permeability of cell membrane, which facilitates the access of chemotherapy drugs and improves the efficiency of the treatment. The goal of the present research was to evaluate the response of murine melanoma to electro-chemotherapy. The electro-pulse device was developed in the Physics Institute of the University of São Paulo, being able to deliver eight 1000 V/cm electric pulses (width of 100 μ s) with frequencies of 1 Hz and 5 kHz. The experiment was carried out using a population of 80 female C57BL/6 mice, which was split into 16 groups of five animals each. The groups were separated between treated and control groups with the former being differentiated by the following procedures: (1) a single intra-tumor bleomycin application, (2) a single electroporation application, (3) a single electroporation application associated with the use of bleomycin chemotherapy (electro-chemotherapy), (4) two consecutive electroporation applications separated by a three day time interval, (5) two consecutive bleomycin applications, (6) two consecutive electro-chemotherapy applications, and (7) the respective control groups.

The B16 melanoma cells were inoculated on the dorsum of mice with the growth of the respective tumors being measured in a daily basis. The analysis included the evaluation of: (1) tumor histology, (2) number of mitoses, (3) counting of micro vessels by the 1A4 marker, and (4) the number of mast cells using the tryptase antibody marker. The average survival of the animals treated with a single electro-chemotherapy was approximately 2.3 times higher than the one observed for the control group.

For the animals treated with two electro-chemotherapy applications it was observed a total (partial) remission of the tumor in 60 (40)% of the cases up to the twelfth day of treatment when the tumors resume their growth. This specific group presented a survival 4.5 times higher than the control. No significant difference was observed between the survival of the groups treated with one and two electroporation application and one and two bleomycin application with their respective controls.

A decrease in the number of mitoses in the groups treated with one and two electro-chemotherapy and a reduction in the number of mast cells in the groups treated with two electroporation and electro-chemotherapy applications were observed. These results indicate the efficiency of the device (developed by the group), as well as in the proposed method developed for murine melanoma treatment.

Key words: Cancer. Chemotherapy. Electroporation. Bleomycin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bicamada lipídica..	22
Figura 2 - Esquema representando os danos no DNA e sua relação com diferentes consequências celulares no organismo..	26
Figura 3 - Aspectos da carcinogênese ambiental e órgãos específicos.	27
Figura 4- As marcas (<i>Hallmarks</i>) do câncer.....	32
Figura 5 - <i>Hallmarks</i> emergentes e características ativadoras..	33
Figura 6- Melanoma cutâneo: resumo das alterações moleculares detectadas Melanoma cutâneo: resumo das alterações moleculares detectadas.....	41
Figura 7 – Estágios da progressão histopatológica da transformação do melanócito.	44
Figura 8 – Princípio da eletroquimioterapia.	48
Figura 9 - Tipos de eletrodos, a distribuição de campo elétrico e aplicação de pulsos elétricos em tumores.	50
Figura 10 - Vista frontal do eletroporador desenvolvido pelo grupo	55
Figura 11 - Vista traseira do aparelho eletroporador desenvolvido pelo grupo.	55
Figura 12 - Primeiro eletrodo fabricado pelo grupo.	56
Figura 13 – Segundo eletrodo fabricado pelo grupo	56
Figura 14 - Circuito do gerador de pulsos do eletroporador desenvolvido pelo grupo.....	57
Figura 15 - Fotografia do animal 5 do grupo 5 no sexto dia após primeiro tratamento	69
Figura 16 - Fotografia do animal 2 do grupo 5 no sexto dia após primeiro tratamento	70
Figura 17 - Fotografia do animal 3 do grupo 5 no sexto dia após primeiro tratamento.....	70
Figura 18 - Fotografia do animal 2 do grupo 5 no décimo segundo dia após primeiro tratamento	71
Figura 19 - Animal 1 do grupo 6 no oitavo dia	73
Figura 20 – Animal 5 do grupo 6 no oitavo dia.....	73
Figura 21 – Animal 4 do grupo 6 no décimo segundo dia	74
Figura 22 - Em A, imagem do animal 3 do grupo tratado no 12º dia após tratamento. Em B, imagem do animal 4 do grupo controle referente ao mesmo dia após o tratamento	74
Figura 23 - Média do volume tumoral e a dispersão da média dos animais tratados.....	76
Figura 24 - Média do volume tumoral dos animais dos grupos 5 e 12 (tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia) e dos grupos 6 e 16 (controles).....	77
Figura 25 - Média de sobrevida dos 4 grupos tratados em função dos dias	79

Figura 26 – Média de sobrevida dos grupos 5 e 6 em função dos dias.....	79
Figura 27 - Curva de sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> dos animais dos grupos 1 ao 6.....	81
Figura 28 - Média do volume tumoral dos grupos 10 e seu controle	87
Figura 29 - Média do volume tumoral dos grupos 11 e seu controle	88
Figura 30 - Média do volume tumoral dos grupos 12 e seu controle	89
Figura 31 - Animal 5 do grupo 10 no oitavo dia após tratamento e o animal 1 do grupo 15 no oitavo dia após tratamento.....	90
Figura 32 - Animal 3 do grupo 11 no oitavo dia após tratamento e o animal 3 do grupo 16 no oitavo dia após tratamento.....	90
Figura 33 – Animal 1 do grupo 12 no oitavo dia após tratamento e o animal 1 do grupo 16 no oitavo dia após tratamento.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Terapias adjuvantes para tratamento de melanoma metastático.....	45
Tabela 2 – Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 1.	65
Tabela 3 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 2.	66
Tabela 4 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 3.	66
Tabela 5 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 4.....	67
Tabela 6 – Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 5	68
Tabela 7 – Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 6	72
Tabela 8 - Média do volume tumoral entre os grupos 5 e 12 e entre os grupos 6 e 16.....	78
Tabela 9 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 7	82
Tabela 10 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 8	82
Tabela 11 – Volume tumoral dos 5 animais do grupo 9.....	83
Tabela 12 – Volume tumoral dos 5 animais do grupo 10.....	83
Tabela 13 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 11.	84
Tabela 14 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 12	84
Tabela 15 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 13	84
Tabela 16 – Volume tumoral dos 4 animais do grupo 14.....	85
Tabela 17 – Volume tumoral dos 5 animais do grupo 15.....	85
Tabela 18 - Volume tumoral dos 4 animais do grupo 16	85
Tabela 19 - Média do volume tumoral dos grupos 7 e seu controle.....	86
Tabela 20 - Média do volume tumoral dos grupos 8 e seu controle.....	86
Tabela 21 – Média do volume tumoral dos grupos 9 e seu controle	87
Tabela 22 – Média do volume tumoral dos grupos 10 e seu controle	87
Tabela 23 - Média do volume tumoral dos grupos 11 e seu controle.....	88
Tabela 24 - Média do volume tumoral dos grupos 12 e seu controle.....	89
Tabela 25 - Média do número de mitoses nos grupos 1 ao 6	92
Tabela 26 – Média de mitoses nos grupos tratados	94
Tabela 27 – Resultado da média de microvasos.....	95
Tabela 28 - Resultado da média de mastócitos grupo 7 e 13	96
Tabela 29 - Resultado da média de mastócitos grupo 8 e 14	96
Tabela 30 - Resultado da média de mastócitos grupo 9 e 14	97
Tabela 31 – Resultado da média de mastócitos grupo 10 e 15.....	97
Tabela 32 – Resultado da média de mastócitos grupo 11 e 16.....	98

Tabela 33 - Resultado da média de mastócitos grupo 12 e 16	98
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 CÉLULAS	21
2.1.1 Melanócitos	23
2.2 NEOPLASIAS	23
2.2.1 Ciclo celular	27
2.2.2 Morte celular	29
2.2.3 Carcinogênese	30
2.2.4 Metástase	36
2.2.5 Angiogênese	38
2.2.6 Imunoistoquímica	39
2.2.7 Melanoma	40
2.2.7.1 Epidemiologia	41
2.2.7.2 Principais subtipos	42
2.2.7.3 Tratamento	45
2.3 ELETROPORAÇÃO	46
2.3.1 Eletroquimioterapia	47
2.3.1.1 Limitações da eletroquimioterapia	51
3 OBJETIVOS	52
3.1 GERAIS	52
3.2 ESPECÍFICOS	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	53
4.1.1 Cultura de células	53
4.1.2 Inoculação do melanoma	54
4.1.3 Aparelho de eletroporação	54
4.1.4 Grupos experimentais	58
4.1.5 Tratamento dos grupos	59
4.1.6 Eutanásia e necropsia	61
4.1.7 Análise histopatológica	61
4.1.8 Análise imunoistoquímica	61
4.1.9 Cálculo do volume tumoral	62

3.1.10 Análise estatística	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 VOLUME DO TUMOR E SOBREVIDA DOS GRUPOS 1 AO 6	64
5.1.1 Grupo 1 (controle dos grupos 2, 3 e 4)	64
5.1.2 Grupo 2 (Bleomicina)	65
5.1.3 Grupo 3 (eletroporação)	66
5.1.4 Grupo 4 (eletroquimioterapia – 1 aplicação)	67
5.1.5 Grupo 5 (eletroquimioterapia – 2 aplicações)	67
5.1.6 Grupo 6 (controle grupo 5)	71
5.1.7 Resultados dos grupos	74
5.2 VOLUME DO TUMOR DOS GRUPOS 7 AO 16	82
5.2.1 Média do volume tumoral dos grupos tratados e controles	86
5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E NÚMERO DE MITOSES	91
5.3.1 Número de mitoses dos grupos 1 ao 6	92
5.3.2 Número de mitoses dos grupos 7 ao 16	92
5.4 IMUNOISTOQUÍMICA DOS GRUPOS 7 AO 16	94
5.5 INTERCOMPARAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS	99
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICE - Número de mitoses dos grupos 7 ao 16	108

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia é uma doença frequente na saúde dos indivíduos. Tem-se verificado nos últimos anos inúmeros avanços no conhecimento do mecanismo de sua formação, sua prevenção e tratamento (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

A industrialização e a progressiva mudança do homem dos campos para as cidades têm sido acompanhadas do aumento da exposição do homem a uma crescente lista de agentes com potencial mutagênico e carcinogênico. Esses fatores explicam a crescente incidência de câncer no mundo e no Brasil. Os cânceres representam a segunda causa isolada de mortalidade (CHAMMAS, 2013).

O termo neoplasia significa “novo crescimento” e resulta de uma alteração no crescimento celular. Dessa alteração, ocorre proliferação celular anormal excessiva, intencional e autônoma, que continua indefinidamente apesar dos estímulos ou efeitos desse crescimento nos tecidos adjacentes. Essas células que se proliferam desordenadamente e sem controle se assemelham, em grau variado, às células normais das quais se originaram, tanto morfológica quanto funcionalmente. Qualquer neoplasia, benigna ou maligna, é denominada tumor, enquanto que para neoplasias malignas o termo câncer é comumente empregado (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

As diversas neoplasias têm propriedades comuns que as distinguem das demais classes de lesão. Entretanto, diferenças de comportamento biológico, morfológico e clínico tornam muito úteis sua divisão em neoplasias benignas ou malignas, sendo importante reconhecer que tais diferenças são, por vezes, muito tênues, daí o conceito de lesões limítrofes que abriga uma série de alterações morfológicas em diferentes tecidos, cujos fenótipos não são suficientemente explícitos para a categorização da neoplasia (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

As neoplasias malignas são, genericamente, conhecidas como câncer, apresentando capacidade de crescimento invasivo e de disseminação por vasos sanguíneos ou linfáticos, sobrevivendo e crescendo como novas lesões em linfonodos ou órgãos distantes, caracterizando as metástases (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

As neoplasias benignas tendem a se apresentar como massas teciduais de crescimento lento e expansivo, comprimindo e não propriamente infiltrando o tecido vizinho. Assumem, assim, aspecto circunscrito, capsulado ou pseudocapsulado, com limites claramente identificados. Por outro lado, as neoplasias malignas tendem a evoluir com crescimento

rápido, com marcação potencial para infiltrar o tecido vizinho e mesmo os vasos linfáticos, sendo as metástases uma de suas características mais marcantes (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

As neoplasias benignas não estão, geralmente, associadas à necrose ou hemorragia, devido às suas características de crescimento expansivo, habitualmente lento. Já as neoplasias malignas apresentam crescimento infiltrativo muitas vezes destrutivo. Tais aspectos, adicionados ao rápido crescimento nem sempre acompanhados por suprimento sanguíneo equivalente, induzem a formação de zonas de necrose intratumoral (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

Cânceres são doenças da expressão descontrolada de genes. O aumento da incidência da doença pode ser explicado, em parte, pela exposição crescente do homem a agentes químicos, físicos e biológicos potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos. Alterações físicas do genoma, eventualmente em razão do acaso ou estimuladas por infecções de patógenos específicos ou condições inflamatórias persistentes, ressaltam a importância da estabilidade do genoma como chave para o desenvolvimento dos tumores (CHAMMAS, 2013).

O câncer decorre da indução de mutações no genoma celular que controla a divisão mitótica, a diferenciação e a apoptose celular. Essas mutações podem ser devido a erros espontâneos na replicação do DNA (indicando translocações cromossômicas), radiações, carcinógenos químicos e vírus oncogênicos. Essas alterações genéticas podem ser herdadas ou adquiridas somaticamente em consequência de processos endógenos ou da exposição aos vários fatores ambientais (WITHROW; VAIL, 2007).

Normalmente há um equilíbrio entre proliferação celular, diferenciação e apoptose. As células normais têm capacidade proliferativa limitada; após inúmeras divisões o processo de decodificação interrompe e controla a multiplicação. As células neoplásicas não respondem aos mecanismos que inibem o crescimento e a divisão celular. São caracterizados mais de 2000 genes envolvidos no controle da proliferação celular, sendo eles os proto-oncogenes (oncogenes), os genes supressores de tumor e os de reparo do DNA (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

Existem características comuns em cânceres que podem ser divididas didaticamente em capacidades intrínsecas à célula tumoral e extrínsecas à célula tumoral. As intrínsecas incluem a capacidade de autorrenovação ilimitada, proliferação autônoma, resistência a fatores anti-proliferativos, evasão à morte celular, evasão de mecanismos de defesa imune, alterações metabólicas adaptativas e instabilidade genômica. As capacidades extrínsecas à

célula tumoral incluem a indução persistente de angiogênese, modificação do microambiente tecidual, evasão da resposta imune específica aos tumores, modulação da resposta inflamatória e de reparo tecidual e cooptação de células desse microambiente nos processos de invasão e metástase (CHAMMAS, 2013).

As neoplasias malignas variam em sua velocidade de crescimento, ao contrário dos tumores benignos. Quase todas as neoplasias malignas são invasivas e, progressivamente, substituem o parênquima normal circunjacente ao órgão afetado. Seguem um padrão aleatório e incoordenado, em que pequenos ninhos de células tumorais irrompem da massa principal podendo invadir tecidos circunjacentes, como vênulas e vasos linfáticos. No lúmen vascular, a célula tumoral pode sofrer interação com as plaquetas, transformando-se em microêmbolos de células tumorais. Estes podem ser transportados pelo sangue ou linfa para outros órgãos. Essa disseminação é denominada metástase (JONES; HUNT; KING, 2000).

Para que ocorra a metástase são necessárias alterações genéticas cumulativas nas células que desencadeiam um processo microinvasivo, caracterizado pela capacidade de migração disfuncional e pelo poder de sobrevivência dessas células em microambientes diferentes do original (WITHROW; VAIL, 2007).

A expansão do tecido tumoral ocorre por angiogênese sustentada, sendo possível o aporte de O₂ e nutrientes. A neovascularização garante a nutrição tumoral e permite o efluxo de células neoplásicas do tumor primário para a circulação (CHAMMAS, 2013).

O câncer é uma doença genética que decorre de múltiplas mutações que se acumulam no genoma. As células neoplásicas adquirem capacidades que interferem na fisiologia celular normal, como auto-suficiência para fatores de crescimento, insensibilidade para elementos inibitórios de proliferação, evasão de apoptose, potencial replicativo infinito, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

O melanoma é um tumor maligno das células produtoras de melanina. Os melanócitos (células produtoras de melanina) têm origem embriológica na crista neural. No início da vida embrionária, essas células migram para outras posições no corpo, particularmente a pele, onde irão produzir melanina. Esse pigmento penetra em células de outros tecidos adjacentes ao melanócito; devido a isso, os tumores dessas células são comuns em pele, mas podem originar-se em qualquer outro lugar (JONES; HUNT; KING, 2000).

Os melanomas ocorrem com frequência variável na maioria das espécies e a característica fundamental dos melanomas é o grande pleomorfismo e variação dos padrões de crescimento e grau de pigmentação das células neoplásicas (JONES; HUNT; KING, 2000).

O melanoma é uma doença agressiva. Frequentemente ocorre acometimento local e distante nos casos em que não há abordagem terapêutica eficaz. Para estágios iniciais da doença, o prognóstico é favorável, sendo que com tratamento cirúrgico (excisão agressiva) observa-se uma boa probabilidade de cura. Mas, para estágios avançados, apesar de cirurgia, radioterapia ou tratamentos sistêmicos, o prognóstico é desfavorável. Em alguns casos em que ocorrem metástases, a cirurgia não pode ser realizada e o tratamento de escolha é a radioterapia. A toxicidade deste tratamento varia de leve (eritema, descamação) a severa (ulceração, atrofia), produzindo sequelas cosméticas ou funcionais (MENÉNDEZ et al., 2009). A vulnerabilidade dos tecidos normais a esse método limita sua eficácia, tendo em vista que esse tumor tem sido considerado relativamente radiorresistente, e dessa forma a radioterapia é comumente usada de forma paliativa nos tumores inoperáveis (TESTORI et al., 2009).

A quimioterapia é amplamente utilizada no tratamento de diversos tumores malignos, porém a taxa de resposta é baixa; para melanoma, a resposta parcial é de 20% a 45%, enquanto que para remissão completa é menor que 5%. (BUZAID; MURREN, 1992). Uma das possíveis razões para essa baixa resposta deve-se à dificuldade de algumas drogas em atravessar a membrana celular e atingir o sítio de ação intracelular. A membrana celular oferece uma barreira que reduz a eficiência delas (SATKAUSKAS et al., 2005)

Pulsos elétricos podem ser usados para aumentar a permeabilidade celular de maneira temporária e reversível. Essa forma de eletroporabilidade é chamada de eletroporação. Essa técnica é atualmente utilizada para a inserção de marcadores moleculares nos tecidos, fusão de células nos tecidos, aumentar a taxa de absorção celular a certas drogas e facilitar a inserção de genes e anticorpos monoclonais nas células (SATKAUSKAS et al., 2005).

O uso de pulsos elétricos para aumentar a exposição das células aos agentes quimioterápicos é denominado de eletroquimioterapia. Atualmente esse método é usado para aumentar a efetividade de drogas não permeáveis como a bleomicina (HELLER et al., 1996a).

A bleomicina é uma potente molécula citotóxica quando no interior das células. Entretanto, ela não é livremente difundida pela membrana plasmática, tendo limitado acesso ao citoplasma. Normalmente ela entra nas células através da interação com as proteínas de membrana, e sua ação citotóxica depende da presença ou ausência dessas proteínas de membrana; devido a isso, a bleomicina é um agente anti-tumoral limitado. A eletroporação das células, bem como dos tecidos, permite a entrada direta da bleomicina no citoplasma; com isso, essa droga é um excelente agente citotóxico quando combinado com eletroporação.

Devido à sua dificuldade em penetrar nas células, seu efeito tóxico no organismo sadio é menor (DOMENGE et al., 1998; MIR; ORLOWSKI, 1999).

Um resultado efetivo do tratamento depende da concentração da droga no local do tumor no momento da administração do pulso elétrico. Quando a bleomicina é administrada pela via endovenosa, uma pobre vascularização tumoral ou circulação sanguínea deficiente pode prejudicar o transporte da droga para o local (HELLER et al., 1998). Entretanto, a concentração de bleomicina no local pode ser aumentada utilizando aplicação da droga intratumoral ou peri-tumoral, dessa forma eliminando a influência negativa dos problemas de vascularização e diminuindo os efeitos colaterais toxicológicos da droga (MIR et al., 1998). Quando não ocorre distribuição homogênea da droga, por via intratumoral, a resposta ao tratamento pode ser prejudicada (RANGEL, 2011).

Este estudo visa utilizar a eletroporação associada à quimioterapia para o tratamento de melanoma induzido em camundongos. Com isso, espera-se que ocorra aumento do efeito deletério da bleomicina nas células tumorais. De fato, sabe-se que a eletroporação facilita a passagem da bleomicina pela membrana celular.

Utilizando essas técnicas de tratamento associadas acredita-se que os efeitos deletérios às células tumorais sejam aumentados, enquanto que os efeitos colaterais sejam minimizados devido ao fato de que a bleomicina precisa estar dentro das células para causar efeitos tóxicos e é uma droga pouco permeável à membrana, o que dificulta sua passagem para o interior das células; quando combinada com pulsos elétricos, penetra nas células, sendo efetiva contra uma variedade de tumores (HELLER et al., 1998).

A hipótese desse estudo de minimizar os efeitos colaterais, observados em quimioterapia, e controlar ou diminuir a evolução tumoral do melanoma, sugere a oportunidade de um tratamento efetivo e com **menores danos colaterais** quando comparado aos tratamentos convencionais já utilizados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS

As células são as unidades estruturais e funcionais dos seres vivos. Existem dois tipos: as procariontes e as eucariontes. Excluídas as bactérias e algas azuis, todos os demais seres vivos são constituídos por células eucariontes, que são maiores que as procariontes e apresentam núcleo celular circundado por uma dupla membrana. Possuem duas porções fundamentais: o citoplasma e o núcleo. No citoplasma localizam-se estruturas envoltas por membrana denominadas organelas, entre elas, mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e os peroxissomos. O espaço entre as organelas é preenchido por matriz citoplasmática contendo proteínas, macromoléculas e íons (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O núcleo é o centro de controle de todas as atividades celulares, e contém nos cromossomos todo o genoma da célula, exceto o pequeno genoma das mitocôndrias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A barreira entre o meio extracelular e intracelular é a membrana plasmática, uma estrutura muito delgada e elástica com espessura entre 7,5 e 10 nm. É formada por duas camadas de moléculas de fosfolípidios com seus grupamentos apolares (hidrofóbicos) voltados para o centro da membrana. Os polares (hidrofílicos) são voltados para as duas superfícies da membrana (GUYTON; HALL, 2002).

Os responsáveis pela formação natural de uma bicamada em um ambiente aquoso são a característica anfipática e o formato dos lipídios, que constituem a membrana plasmática. As extremidades hidrofílicas formam interações eletrostáticas com as moléculas de água e as extremidades apolares tendem a se direcionar para o interior da bicamada. Se uma fenda é feita na bicamada, os fosfolípidios se rearranjam de forma que as caudas hidrofóbicas não fiquem em contato com a água (LODISH et al., 2008).

Observa-se na membrana a existência de moléculas proteicas que se inserem parcial ou totalmente na membrana (Figura 1). A membrana plasmática desempenha importante função de manutenção da constância do meio intracelular e as proteínas desempenham papel fundamental nessa função (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Figura 1 - Bicamada lipídica, com grande número de moléculas de proteína através dela. Moléculas de carboidrato presas às moléculas de proteína na face externa da membrana, além de moléculas adicionais de proteína em sua face interna (GUYTON; HALL, 2002).

A estrutura da membrana apresenta permeabilidade seletiva às substâncias necessárias ao metabolismo celular ou que devam ser excretadas; essa seletividade se dá pelo gradiente de concentração dessas substâncias (LODISH et al., 2008).

Através do processo de difusão passiva, pequenas moléculas e íons podem atravessar a membrana plasmática sem consumo de energia. Já pelo transporte ativo, há consumo de energia e a travessia ocorre através das proteínas transportadoras.

Com o transporte facilitado, as proteínas carreadoras atravessam a membrana, mas sem gasto de energia. Nos três casos não há modificação morfológica da membrana. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Entre o líquido intracelular e extracelular há uma diferença de potencial elétrico (V) denominada potencial de membrana. O potencial elétrico do fluido extracelular, por convenção, é considerado nulo, e o potencial no interior da membrana é de aproximadamente -70 mV. Na maioria das células o potencial de membrana V permanece inalterado, desde que não haja influências externas (OKUNO et al., 1982).

O potencial V é constante dentro e fora da célula, devendo, portanto, variar no interior da membrana. Essa variação não pode ser medida devido à espessura delgada da membrana (OKUNO et al., 1982).

2.1.1 Melanócitos

Os melanócitos são células pigmentadas que se localizam na camada basal da epiderme, infundíbulo e na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e em leptomeninges. Os melanoblastos, células precursoras dos melanócitos, são de origem neuroectodérmica, que migram a partir da crista neural do embrião a partir de 2 a 3 semanas após fertilização. Na derme, os melanoblastos sofrem maturação e diferenciação, dando origem a células precursoras de melanócitos, que na epiderme diferenciam-se completamente em melanócitos (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

Essas células produzem um pigmento chamado melanina. Localiza-se geralmente nas camadas basal e espinhosa da epiderme. Trata-se de uma célula de citoplasma globoso, de onde partem prolongamentos que se dirigem em direção à superfície da epiderme, e com núcleo de forma irregular e central. Os prolongamentos dos melanócitos penetram em reentrâncias das células das camadas basal e espinhosa e transferem os grânulos de melanina para as células dessas camadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A síntese de melanina ocorre no interior dos melanócitos, e as tirosinases, enzimas expressas preferencialmente por melanócitos e eventualmente por melanomas, têm importante participação nesse processo. O grau de diferenciação dessas células pode ser avaliado pela capacidade de síntese de melanina (BELFORT; SCHMERLING, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Há grande variabilidade da densidade, distribuição e morfologia dos melanócitos na epiderme. Na pele fotoexposta, verifica-se maior número de melanócitos, confluência mais frequente e atipia citológica (TAKANO; ABREU E LIMA, 2010).

2.2 NEOPLASIAS

Complexas vias estão envolvidas no desenvolvimento dos organismos multicelulares eucariontes. Cada organismo é originado a partir de uma única célula, progredindo rapidamente para a proliferação e diferenciação celular, seguidas pelo estado de reparo equilibrado e senescência. A informação genética de cada parte do organismo maduro existe

no genoma de cada célula, porém a diferenciação celular faz com que não ocorra a expressão de todos os genes (HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

Nos tecidos normais há um equilíbrio entre proliferação celular, diferenciação e morte celular programada ou apoptose. Alterações nos mecanismos que controlam os processos de ativação e repressão de genes podem desencadear neoplasias (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008; HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

O termo neoplasia significa “novo crescimento” anormal do tecido, e se desenvolve mais rápido do que o tecido normal adjacente. Define-se como uma perturbação do crescimento celular em que ocorre alteração permanente e hereditária nas células. Resulta em proliferação celular anormal excessiva, intencional e autônoma, que continua indefinidamente apesar dos estímulos ou efeitos da neoplasia nos tecidos adjacentes. Podem ser malignos ou benignos, mas o termo câncer é restrito aos crescimentos malignos. As neoplasias malignas diferem da benigna pela capacidade de invasão em tecidos adjacentes e distantes (metástases). O câncer decorre da ruptura irreversível dos mecanismos homeostáticos que regulam a proliferação, diferenciação e apoptose celular (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008; MORRIS; DOBSON, 2007).

O câncer é considerado uma doença genética, pois ocorrem mudanças específicas no DNA. Mudanças iniciais que conduzem à transformação maligna tipicamente envolvem a regulação da fase G1 (gap 1) / S do ciclo celular (HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

A molécula de DNA é a base da nossa identidade genética, e sua manutenção é essencial para garantir que possa ser transmitida corretamente por meio de todas as gerações celulares. Essa molécula é atacada constantemente por vários agentes físicos e químicos, externos à célula e também endógenos, que são capazes de danificar o DNA e causar instabilidade. O DNA é uma molécula não renovável e insubstituível, o que faz com que danos, quando não reparados, sejam permanentes, podendo gerar sérias consequências para o organismo e para a manutenção da descendência (SOLTYIS et al., 2013).

Toda célula possui muitos sistemas de reparo de DNA, que protegem essa molécula contra os danos ocorridos constantemente. Dependendo da extensão do dano causado e da eficiência de funcionamento do reparo, essas lesões podem permanecer no genoma celular, o que acarreta na perda da capacidade de ler e transcrever mensagens vitais para as células, aumentando o risco de desenvolvimento de tumores. Por essa razão, as proteínas que participam no reparo do DNA são conhecidas como guardiãs do genoma e são consideradas supressoras de tumor (SOLTYIS et al., 2013).

As injúrias na molécula de DNA geram consequências geralmente desfavoráveis e determinadas por vários parâmetros, como o tipo de dano causado. Algumas lesões são primariamente mutagênicas e promotoras de câncer, outras são citotóxicas ou citostáticas e desencadeiam mecanismos de morte celular e senescência. As lesões mutagênicas causam mutações na sequência do DNA que se acumulam ao longo do tempo e ocasionalmente levam à formação de tumores. Essas lesões correspondem a pequenas modificações de base, incluindo as alterações espontâneas, sítios AP e bases oxidadas e, normalmente, não bloqueiam processos metabólicos do DNA, mas influenciam principalmente sua fidelidade de duplicação. As lesões podem causar alterações mais extensas na sequência do DNA, tais como deleções, inserções, duplicações e inversões. Esses eventos de instabilidade cromossômica estão intimamente associados com carcinogênese. As transformações neoplásicas são resultado de alterações cumulativas no genoma, o que altera o padrão de expressão de genes especialmente críticos para a divisão celular, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. A Figura 2 ilustra alguns tipos de lesões em uma molécula de DNA e as principais consequências biológicas dessas lesões, quando não reparadas, para a célula e para o organismo (SOLTYS et al., 2013).

Figura 2 - Esquema representando os danos no DNA e sua relação com diferentes consequências celulares no organismo (SOLTYS et al., 2013).

A multiplicidade de fatores ambientais associados ao desenvolvimento de neoplasias é bastante ampla. Há agentes aos quais nos expomos pela pele, por inalação ou ingestão, que possuem a propriedade de interagir com o DNA e promover câncer. A radiação ionizante é um exemplo clássico desse tipo de fenômeno. Por outro lado, há agentes que têm a base de seu potencial carcinogênico nos produtos de seu metabolismo. As lesões ao DNA causadas por esses agentes, se não adequadamente reparadas, levam às mutações estruturais do genoma, caracterizando a fase de iniciação do processo de carcinogênese (figura 3) (SALDIVA, 2013).

Figura 3 - Aspectos da carcinogênese ambiental e órgãos específicos (SALDIVA, 2013).

Processos inespecíficos que promovam inflamação crônica podem contribuir para a expansão de clones celulares transformados ou, alternativamente, reduzir a eficiência dos mecanismos de apoptose. Alterações do ciclo de divisão celular, induzidas pela ação de hormônios ou disruptores endócrinos, estão também associadas a um maior risco para o desenvolvimento de neoplasias (SALDIVA, 2013).

2.2.1 Ciclo celular

O ciclo de uma célula compreende um período de repouso e um período ativo. O período de repouso (G0) ou fase quiescente corresponde a todas as células que podem entrar

em mitose; essas células mantêm uma síntese proteica mínima. O período ativo compreende quatro fases, descritas a seguir:

- Fase G1 (gap 1) – início após a mitose; a célula produz proteínas essenciais à síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), e apresenta crescimento citoplasmático intenso. Essa fase pode durar horas, meses ou anos de acordo com o tecido;
- Fase S (síntese) – A célula mãe duplica seu DNA. As duas cadeias que constituem a dupla hélice separam-se e cada nucleotídeo é o molde para a síntese de uma nova molécula;
- Fase G2 (gap 2) – Representa o período de crescimento celular, fase pré-mitótica. Ocorre discreta síntese de ácido ribonucleico (RNA) e proteínas essenciais para a mitose;
- Fase M (mitose) – Conduz o desdobramento dos cromossomos e divisão em duas células-filhas geneticamente idênticas. Evento contínuo dividido em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase; ocorrem modificações no núcleo e no citoplasma.

Após essa fase a célula pode entrar na fase G1, permanecer em repouso (fase G0) ou entrar em morte celular (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008; HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010; LANORE; DELPRAT, 2004).

A divisão, proliferação e diferenciação celular são estritamente controladas para criar um balanço entre o nascimento de uma célula normal e morte celular. O desarranjo nesse mecanismo homeostático pode causar proliferação descontrolada ou perda da capacidade de morte celular, conduzindo a célula normal em um fenótipo maligno (WITHROW; VAIL, 2007).

A maioria das células de um tecido normal está em G0, e é estimulada para entrar no ciclo celular em resposta a fatores externos, incluindo fatores de crescimento e moléculas de adesão celular (WITHROW; VAIL, 2007).

A progressão pelo ciclo celular é mediada pela ativação sequencial e inativação de uma classe de proteínas chamada de ciclina dependentes de kinases (CDKs); elas regulam pontos de verificação que coordenam sinais mitogênicos e inibitórios (WITHROW; VAIL, 2007).

2.2.2 Morte celular

Os dois mecanismos de morte celular são necrose e apoptose. Na necrose ocorre o envelhecimento celular e alteração na permeabilidade da membrana, ocasionando o extravasamento do conteúdo citoplasmático (LANORE; DELPRAT, 2004).

Na apoptose ocorre a morte celular programada, que pode ser desencadeada por estímulos externos, por meio de receptores específicos na superfície ou por estímulos internos de estresse intracelular, provocando lesões e alterações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Tanto a via externa quanto a via interna culminam com a ativação das proteases conhecidas como caspase-3 (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008; HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010; LANORE; DELPRAT, 2004).

A ativação das caspases acontece por dois mecanismos, um pela via mitocondrial ou intrínseca, e outro pela via extrínseca, ocorrendo por meio de receptores para a morte. Na via mitocondrial, a ativação inicia-se com sinais que levam à liberação de citocromo-c, desencadeando uma série de reações que levam à morte celular. A via extrínseca baseia-se nos receptores para a morte: fator de necrose tumoral (TNF), Fas e TRAIL para induzir todo processo (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

A apoptose e a mitose atuam no controle de todas as populações celulares, sejam elas normais ou anormais, e mantêm a manutenção da homeostase dos organismos, através do equilíbrio entre as taxas de destruição e proliferação celular, respectivamente. Quando esse equilíbrio é alterado em favor do prolongamento de sobrevivência celular, pode desencadear o processo de carcinogênese (WITHROW; VAIL, 2007).

A origem das células anormais que formam o tumor não depende somente da proliferação celular desordenada, decorre em parte de apoptose descontrolada ou imperfeita (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

A proteína p53 tem um papel importante no processo de apoptose. Quando uma anomalia é detectada durante o ciclo celular, a p53 bloqueia o ciclo e permite o reparo; se o reparo não for possível, ocorre apoptose (LANORE; DELPRAT, 2004).

2.2.3 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo que ocorre em múltiplas etapas. Gradativamente as células adquirem características de malignidade por meio de uma série de alterações genéticas progressivas e cumulativas (CHAMMAS, 2013).

Existem diversos modelos propostos para explicar os mecanismos de carcinogênese, sendo o da iniciação, promoção e progressão o mais utilizado (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

O modelo de iniciação, promoção e progressão (IPP) é o ponto inicial para definir a base genética do câncer. Ao contrário de doenças causadas por defeitos em um único gene, o câncer é uma doença complexa e multigênica. Este modelo é um dos primeiros a reconhecer a progressão sequencial de mutações que podem representar o câncer (WITHROW; VAIL, 2007).

Na iniciação (primeira fase), uma única célula do tecido, aparentemente normal, sofre por meio de estímulos alterações genotípicas. Essas mudanças podem comprometer os mecanismos reguladores do crescimento e desenvolvimento celular (proto-oncogênese). Nem todas as células iniciadas originam um tumor, pois muitas entram no processo de apoptose (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

Nessa fase, uma mutação genética resulta numa célula somática com potencial de replicação ilimitado, com vantagens na sobrevivência e no crescimento. Essa mutação sozinha não é o suficiente para o crescimento do tumor, mas uma segunda mutação (ou uma série delas) aumenta a capacidade da célula para competir com outras do microambiente, levando à sua expansão potencial em uma massa reconhecível (fase de promoção) (WITHROW; VAIL, 2007).

Na promoção (segunda fase), a célula iniciada começa a multiplicação, expressando alterações fenotípicas em suas células-filhas que passam a ter autonomia, formando um clone (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008).

A fase de promoção tumoral corresponde ao processo de perpetuação das células iniciadas, por meio de sua sobrevivência e expansão clonal, ocorrendo, assim, a transferência do material genético contendo mutações para as células-filhas. O desenvolvimento do câncer, a partir desses clones, depende, dentre outros fatores, do aumento da sobrevivência dessas células e de um estímulo à proliferação celular. A resposta inflamatória propicia a ocorrência desses dois pré-requisitos (SOUSA; CUNHA, 2013).

Após a fase de promoção, ocorre a fase de progressão (terceira fase), na qual surgem clones com potencial de invasão tecidual e formação de metástase (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008). Essa terceira fase de mutações reforça o potencial de malignidade das células que conduzem à doença clínica (WITHROW; VAIL, 2007).

A progressão tumoral é a etapa final da carcinogênese. Nessa fase, as células cancerosas irão se estabelecer, crescendo e interagindo com células do microambiente tumoral. As ações de mediadores inflamatórios promovem a evasão dos mecanismos apoptóticos, o aumento da sobrevivência celular e vantagens replicativas, além de serem intimamente relacionados com processos de angiogênese e metástase (SOUSA; CUNHA, 2013).

As alterações indutoras do processo devem estar presentes na maioria das células tumorais. As alterações consequentes do processo de transformação podem estar presentes em uma subpopulação das células e postula-se que estejam relacionadas à geração da heterogeneidade genética da massa tumoral (CHAMMAS, 2013).

De um modo geral, a construção de um microambiente inflamatório, por meio do recrutamento e da ativação de leucócitos, determina a ocorrência de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), bem como de inúmeros mediadores inflamatórios, tais como citocinas e eicosanoides, que podem ser responsáveis por desestabilizar o genoma celular, levando à iniciação tumoral (SOUSA; CUNHA, 2013).

Os EROs e ERNs apresentam a capacidade de provocar lesão diretamente sobre a molécula de DNA, gerando mutações. A presença de um microambiente rico em citosinas pode aumentar, ainda, a concentração dessas espécies reativas no meio intracelular de células pré-malignas, potencializando seu efeito. Os mediadores inflamatórios modulam negativamente vias de reparo do DNA; além disso, EROs podem causar inativação direta no sistema de reparo. Uma vez que essa maquinaria encontra-se desativada, as taxas de mutações aumentam e vários genes supressores tumorais tornam-se inativos (SOUSA; CUNHA, 2013).

Para a formação do câncer, as células normais precisam sofrer o mínimo de mutações que expressam pelo menos seis marcas do câncer (*hallmarks of cancer*), capacitando-as para sinalização proliferativa, evitar supressores de crescimento, impedir morte celular, permitir imortalidade replicativa, induzir angiogênese e ativar invasão e metástases (Figura 4). Estes fatores são ativados pela instabilidade genômica, que gera mutações randômicas, incluindo rearranjos cromossômicos e processo inflamatório nas lesões pré-malignas e potencialmente malignas, o que promove a progressão tumoral (Figura 5) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 4 – As marcas (*Hallmarks*) do câncer. Esta ilustração abrange 6 *Hallmarks* propostos por HANAHAN e WEINBERG há mais de uma década. Desde então, muitos estudos se desenvolveram com base nesses *Hallmarks* (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células cancerígenas possuem também outras duas características emergentes que facilitam o desenvolvimento e progressão do câncer. A primeira envolve a reprogramação do metabolismo energético, a fim de suportar o crescimento e proliferação celular contínuos. A segunda envolve a evasão ativa dessas células ao ataque e eliminação pelo sistema imunológico; esta capacidade beneficia o desenvolvimento e progressão tumoral (figura 5) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 5 – *Hallmarks* emergentes e características ativadoras (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As causas do câncer não são necessariamente os eventos de mutação, alterações estruturais chamadas epigenéticas também estão associadas à regulação gênica (WITHROW; VAIL, 2007). Tais alterações são dependentes do controle de transcrição de genes, associadas, por exemplo, à forma como a cromatina se organiza ou à expressão de elementos como microRNAs, que controlam diretamente a expressão de genes, sem serem eles mesmos traduzidos em proteínas (CHAMMAS, 2013). O silenciamento de alguns genes supressores de tumor em alguns cânceres ocorre mais frequentemente por metilação epigenética (WITHROW; VAIL, 2007).

A inflamação pode levar a modificações epigenéticas do DNA, induzidas por metilações em sequências gênicas específicas, ou por modificações de histonas, tendo como consequência o silenciamento de genes supressores tumorais, como os do sistema MMR (SOUSA; CUNHA, 2013).

A inflamação é um componente essencial da imunidade inata, permitindo que organismos multicelulares restabeleçam a homeostasia frente a estímulos ou condições nocivas, tais como infecções ou lesões teciduais. Quando um processo inflamatório torna-se desregulado, seja pela permanência de um patógeno, por lesões teciduais recorrentes ou reparadas de maneira incompleta, ou em decorrência de alguma falha de seus mecanismos

reguladores, o fenômeno persiste e a resposta celular passa a se caracterizar como inflamação crônica. O tecido acometido torna-se repleto de linfócitos e macrófagos de vários subtipos, que sintetizam e liberam uma grande quantidade de citocinas, de fatores de crescimento, de mediadores lipídicos e de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) capazes de provocar lesões no DNA, estimular a proliferação celular e sua sobrevivência, além de promover o remodelamento tecidual. Esse processo é extremamente favorável para o surgimento de novos cânceres e para a progressão daqueles já estabelecidos (SOUSA; CUNHA, 2013).

Os eventos inflamatórios associados ao câncer podem ser divididos em extrínsecos e intrínsecos, dependendo da origem dos agentes indutores da inflamação. Dentre os agentes extrínsecos caracterizam-se a inflamação crônica induzida por agentes infecciosos, doenças autoimunes e agentes ambientais. Atualmente, mais de 20% dos casos de cânceres estão relacionados às infecções crônicas, outros 30% podem ser atribuídos aos componentes dos cigarros e dos poluentes inalantes, e 35% relacionam-se aos componentes da dieta. Os eventos inflamatórios intrínsecos foram descobertos pelo fato de que a maioria dos tipos histológicos de câncer, se não todos, deflagram uma resposta inflamatória própria, independentemente da existência prévia de inflamação no sítio tumoral, capaz de construir um microambiente inflamatório pró-tumoral (SOUSA; CUNHA, 2013).

Mesmo em tumores não associados a condições inflamatórias prévias, a ocorrência de eventos genéticos, que culminam com a ativação de proto-oncogenes ou com a inativação de genes supressores tumorais, é capaz de ativar a transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios, como citocinas (IL-6, IL-1 β), fatores de crescimento (CSF-1), quimiocinas (IL-8, CCL2, CCL20) e metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9). A carência de vascularização, característica comum a todos os tumores de grande volume, torna seus microambientes sítios privados de oxigênio e nutriente, resultando em necrose das células tumorais. Esse processo também libera citocinas pró-inflamatórias das células necróticas (SOUSA; CUNHA, 2013).

O perfil das células do infiltrado inflamatório tumoral, assim como dos mediadores inflamatórios liberados, ditará qual será a direção que o binômio inflamação-câncer seguirá: seja um perfil inflamatório que promove o crescimento e progressão tumoral, seja um perfil de inflamação que terá um papel crucial na imunidade antitumoral. Em tumores já estabelecidos, esse balanço encontra-se profundamente desviado para o crescimento tumoral. Entretanto, é seguro afirmar que a inflamação que favorece o crescimento tumoral e a

inflamação antitumoral coexistem em diferentes pontos ao longo do processo de carcinogênese (SOUSA; CUNHA, 2013).

Independentemente da via deflagradora da inflamação, a liberação de citocinas e de fatores de crescimento por células do microambiente tumoral inicia cascatas de sinalização intracelulares, culminando com a ativação de fatores de transcrição. Tais fatores controlam genes relacionados a inúmeros processos tumorigênicos, incluindo genes antiapoptóticos, genes que controlam a proliferação celular, genes respondedores a estresse e lesão, genes que codificam fatores pró-angiogênicos e genes que codificam quimiocinas e seus respectivos receptores (SOUSA; CUNHA, 2013).

A inflamação representa um componente-chave para o desenvolvimento e a progressão tumoral, afetando todos os aspectos da carcinogênese. O papel de células inflamatórias no microambiente tumoral, sobretudo de macrófagos, é crucial (SOUSA; CUNHA, 2013).

As mutações progressivas que levam ao câncer, juntamente com a seleção e instabilidade genética, parecem fornecer razões suficientes para a heterogeneidade genética encontrada na maioria dos tumores. No entanto, isso assume que todas as células tumorais possuem uma capacidade igual de auto-renovação e que a proliferação é um processo (aleatório). Até recentemente, esta foi a hipótese dominante para a origem e progressão de tumores; no entanto, uma hipótese para competir com estas observações é que a autorrenovação é limitada a uma pequena população de células-tronco do câncer, em muitos aspectos semelhantes aos de células-tronco pluripotentes normais, que dão origem a uma população de células de linhagem comprometida, que formam os órgãos e tecidos (WITHROW; VAIL, 2007).

As alterações indutoras do processo devem estar presentes na maioria das células tumorais. As alterações consequentes do processo de transformação podem estar presentes em uma subpopulação das células e postula-se que estejam relacionadas à geração da heterogeneidade genética da massa tumoral (CHAMMAS, 2013).

As capacidades adquiridas pelas células tumorais refletem as características de toda a população de um dado tumor. Contudo, como essa população é heterogênea, não são necessariamente todas as células que compartilham as mesmas características. As células que apresentam capacidade de autorrenovação podem não ser as mesmas que apresentam a capacidade de crescimento autônomo sustentado ou de invasão em tecidos vizinhos (CHAMMAS, 2013).

Como ocorre em diferentes órgãos, em que há interação de diferentes células e de tipos celulares em variados graus de diferenciação, em tumores observamos relações semelhantes de especialização e hierarquização de funções (CHAMMAS, 2013).

2.2.4 Metástase

Cerca de 90 % das mortes relacionadas ao câncer são decorrentes do crescimento de metástases. O processo para o surgimento de metástases envolve uma biologia complexa e é altamente dependente das interações entre vários componentes do microambiente tumoral (SOUSA; CUNHA, 2013).

Durante a fase de progressão tumoral, muitas células são constantemente desprendidas dos tumores, mas nem toda neoplasia tem a capacidade de se tornar metastática (HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

O processo microinvasivo é caracterizado pela capacidade de migração celular disfuncional e pelo poder de sobrevivência em microambientes diferentes do original da célula transformada (MORRIS; DOBSON, 2007).

Para que ocorra a metástase as células devem ser capazes de realizar a transição epitélio-mesenquimal, na qual as células adquirem características fibroblastoides, que aumentam sua motilidade e permitem seu avanço pelo tecido epitelial subjacente, ultrapassando os limites da membrana basal, e, finalmente, alcançando vasos sanguíneos ou linfáticos eferentes. A perda da expressão de E-caderina destaca-se como um evento chave nesse processo que pode ser deflagrado por várias citocinas, incluindo TGF- β , IL-1, TNF- α e IL-6 (SOUSA; CUNHA, 2013).

A neovascularização que ocorre na angiogênese, além de viabilizar o aporte de nutriente e oxigênio para o tecido tumoral, também permite o efluxo de células neoplásicas do tumor primário para a circulação sistêmica. A célula tumoral sofre interação com as plaquetas, formando microêmbolos e favorecendo a disseminação à distância (MORRIS; DOBSON, 2007).

Para que a invasão tecidual se efetive, é necessária a ocorrência de proteólise da matriz extracelular no fronte invasivo do câncer. De fato, mediadores liberados por células inflamatórias nessas regiões tumorais, sobretudo macrófagos e neutrófilos, regulam a síntese e

a atividade de diversas enzimas capazes de exercer essa função, facilitando, além da invasão tecidual, a intravasão e extravasão das células malignas (SOUSA; CUNHA, 2013).

A disseminação neoplásica ocorre através da infiltração, embolização, segregação, sobrevivência e proliferação (WITHROW; VAIL, 2007).

Na infiltração ocorre o rompimento da membrana basal pela ação de enzimas líticas, pela ausência de inibição de contato, pela mobilidade oncocitária ou também pela manipulação do tumor. Na fase de embolização observa-se o desprendimento dos oncócitos não coesos (HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

A segregação ocorre quando os oncócitos de origem embólica param em vasos de menor calibre ou em regiões distintas de sua origem (HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010). Nesta fase de intravasamento, as células cancerosas penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos. A inflamação pode estimular essa fase por meio da produção de mediadores que aumentam a permeabilidade vascular, como o $\text{TNF-}\alpha$. Também é estimulada por prostaglandinas, citocinas, que aumentam a sobrevivência das células desalojadas, e por enzimas que abrem caminho para a passagem das células cancerosas até os capilares (SOUSA; CUNHA, 2013).

Na fase de sobrevivência, cerca de 90% das células neoplásicas que atingem a circulação são destruídas por fagócitos ou anticorpos, ou podem ficar retidas e em latência (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008; HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010). Dentro dos vasos sanguíneos, as células cancerosas precisam sobreviver em suspensão e resistir à morte induzida pelo desalojamento de seu tecido de origem. Mediadores inflamatórios, liberados por células inflamatórias circulantes, podem aumentar a sobrevivência dessas células. Algumas dessas citocinas podem ligar fisicamente as células tumorais a células monocíticas ou a plaquetas, permitindo que elas trafeguem juntas pela circulação, protegendo-as da morte mediada por células natural *killer*, funcionando assim como um mecanismo de evasão da imunovigilância (SOUSA; CUNHA, 2013).

Na etapa de proliferação, nem todos os oncócitos têm capacidade de proliferar e colonizar tecidos distintos. Isso depende de alterações bioquímicas na membrana celular, que, além de causar a perda de inibição de contato, podem facilitar o reconhecimento de tecidos ou áreas de maior afinidade com os oncócitos (HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

O extravasamento das células tumorais é mediado por selectinas e integrinas que determinam a adesão dessas células ao endotélio vascular dos tecidos-alvo da metástase; o $\text{TNF-}\alpha$ pode modular positivamente a expressão dessas moléculas, favorecendo, assim, o surgimento de metástases. Os progenitores metastáticos interagem com as células do

microambiente do nicho pré-metastático e começam a se proliferar, gerando o nódulo metastático estabelecido (SOUSA; CUNHA, 2013).

Para que ocorra metástase, a célula tumoral deve ser capaz de desprender-se do tumor primário (perda da interação célula a célula); induzir a angiogênese; transpor a membrana basal e as células endoteliais alcançando a circulação sanguínea e ou linfática; sobreviver na circulação sanguínea; interagir com o endotélio, extravasar e proliferar no órgão alvo (DALECK; DeNARDI; RODASKI, 2008; HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

2.2.5 Angiogênese

A angiogênese é um processo fisiológico definido como a formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes ou de células endoteliais progenitoras. Durante a progressão tumoral, sua ocorrência é imprescindível (SOUSA; CUNHA, 2013). As células cancerosas possuem uma capacidade extrínseca de induzir a formação de uma nova vasculatura, que permite oxigenar e nutrir a massa tumoral (DIAS; CAIADO, 2013).

A vascularização tecidual é controlada por um equilíbrio dinâmico entre ativadores e inibidores de angiogênese. Esse equilíbrio é explicado pela manutenção da homeostase vascular ou da criação de instabilidade, permitindo a formação de novos vasos em situações de reduzido aporte de oxigênio ou de nutriente (DIAS; CAIADO, 2013).

A angiogênese é deflagrada por situações de estresse tecidual, tais como privação de nutrientes e, principalmente, ambientes de baixas tensões de oxigênio. De fato, sabe-se que os macrófagos se acumulam em regiões tumorais nas quais existe hipóxia e próximos às áreas de necrose tumoral (SOUSA; CUNHA, 2013).

As proteínas da família do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), os primeiros fatores angiogênicos identificados, são produzidos pela maior parte dos cânceres. VEGF-A, produzido pelas células tumorais, liga-se aos seus receptores tirosina quinase específicos, ativando uma cascata de sinalização intracelular que leva à proliferação e diferenciação das células endoteliais dos vasos sanguíneos, resultando na formação de novos capilares. No entanto, para que VEGF possa comunicar com as células endoteliais dos vasos sanguíneos e induzir esses efeitos, estas têm que deixar de receber parte dos sinais de estabilidade e homeostase. Ao perder os sinais de estabilidade e homeostase, as células

endoteliais sobre-expressam receptores de fatores pró-angiogênicos como VEGF, respondendo, assim, de forma exuberante à presença desses fatores. (DIAS; CAIADO, 2013).

Acredita-se que o processo de angiogênese tumoral se inicia pela indução da produção de fatores pró-angiogênicos, como VEGF, por parte de células tumorais em situação de reduzido oxigênio ou privação nutricional. No caso de angiogênese fisiológica, após a formação de novos capilares são ativados sinais inibidores do processo angiogênico, já na angiogênese tumoral isso não ocorre, fazendo com que o crescimento e eventual metastatização sejam contínuos (DIAS; CAIADO, 2013).

2.2.6 Imunoistoquímica

É crescente a aplicação de técnicas imunoistoquímicas, que auxiliam na caracterização da lesão neoplásica. Essas técnicas permitem a análise de variáveis moleculares, como expressão diferencial de proteínas ou suas modificações, permitindo classificar mais precisamente uma dada lesão ou, então, subclassificá-la (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

O uso mais popular da imunoistoquímica é na determinação da origem histogenética das neoplasias, mas hoje existem diversas aplicações práticas: tais como a descrição de novas entidades clínicas; a diferenciação de processos benignos de neoplasias malignas; a pesquisa de sítio primário desconhecido; a identificação de micrometástases; a validação de novos genes identificados em estudo de expressão gênica; de indicadores prognósticos e de marcadores preditivos da resposta à terapia (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

A perspectiva futura é de que variáveis moleculares tenham seu uso progressivamente mais difundido, munindo o patologista de ferramentas que lhe permitam agregar informações ao diagnóstico, classificando lesões em potencialmente responsivas a um ou outro tratamento. Recentemente, a pesquisa de biomarcadores, principalmente pelo método imunoistoquímico, tem servido cada vez mais como critério adicional para escolha terapêutica (ALVES; DeMELLO; LONGATO FILHO, 2013).

2.2.7 Melanoma

O melanoma é um tumor maligno originado da proliferação anormal dos melanócitos. É mais comumente diagnosticado em indivíduos jovens e apresenta um comportamento agressivo com grande prevalência de morte (LeBOIT et al., 2006).

O melanoma é menos frequente do que os outros tumores de pele. Também é mais frequente em populações de pele clara e expostas à radiação solar. Indivíduos de pele escura possuem menor risco de apresentá-lo. Seu prognóstico é bom para os tumores localizados, enquanto, para melanomas metastáticos, é reservado (INCA, 2014).

Essa sensibilidade diferencial, associada à cor da pele, ou mais propriamente da reação da pele à exposição intermitente a radiações do tipo UVA e UVB, é um dos melhores exemplos da interação entre fatores genéticos e físicos no desenvolvimento de tumores (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

Pode ser fatal quando não tratado, tendendo a se disseminar por via linfática e hematogênica. Apesar de apresentar prognóstico reservado, quando diagnosticado precocemente obtêm-se bons resultados com o tratamento (LeBOIT et al., 2006).

Algumas variações como fatores constitucionais individuais, região anatômica e alterações ambientais, em especial a fotoexposição, influenciam o número, morfologia e forma de distribuição dos melanócitos na epiderme, sendo fundamentais para a interpretação de biópsias de pele (LeBOIT et al., 2006).

O desenvolvimento do melanoma é consequência da disfunção de múltiplos genes relacionados à manutenção da homeostasia celular. Não há só uma via que leva ao desenvolvimento do melanoma, algumas das alterações moleculares envolvidas em seu surgimento estão representadas na figura 6 (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

Figura 6 - Melanoma cutâneo: resumo das alterações moleculares detectadas. Essa figura ilustra os mecanismos moleculares alterados em cada uma das seis categorias, encontradas em células tumorais, e que estão associados com a progressão do melanoma (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

2.2.7.1 Epidemiologia

Alguns fatores de risco são importantes no desenvolvimento do melanoma, entre eles estão os fatores ambientais e os genéticos. Os componentes genéticos incluem o tipo de pele, número de nevos, atipia dos nevos e histórico familiar (VRIES; COEBERGH, 2004).

A exposição a raios ultravioletas é o principal fator de risco ambiental para o melanoma. Difere de acordo com a dose, a forma de exposição (exposição crônica ou intermitente) e o período que ocorre a exposição (infância ou fase adulta). Exposições intermitentes na infância aumentam o fator de risco, embora não seja um fator determinante; muitas queimaduras solares ao longo da vida também aumentam esse fator (VRIES; COEBERGH, 2004).

A radiação ultravioleta (UV) é capaz de promover dano ao DNA pela produção de radicais livres, provenientes da hidrólise da água. O estresse oxidativo tem o potencial de promover mutações pontuais capazes de induzir e promover neoplasias da epiderme, notadamente carcinomas escamosos e melanomas (SALDIVA, 2013).

Em países ensolarados, com o Brasil, após um único dia de exposição aos raios solares, mais de 100.000 fotoprodutos de UV podem ser formados no genoma de cada queratinócitos da pele. Quando o DNA é exposto à luz UV, pirimidinas adjacentes se ligam

covalentemente, gerando principalmente os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e dímeros de pirimidina (6-4) pirimidona (fotoprodutos 6-4). Os CPDs são mais abundantes, perfazendo cerca de 75 a 90% das lesões, enquanto que os fotoprodutos 6-4 perfazem 10 a 25% do total. Essas lesões resultam em distorções na estrutura da molécula de DNA (SOLTYS et al., 2013).

Sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa no Brasil (6.230 casos novos em 2012, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul do país. Em 2010 observou-se letalidade de 1.507 pessoas, sendo 842 homens e 665 mulheres (INCA, 2014).

A incidência tem aumentado cerca de 3 a 8% ao ano em países com população de ascendência nórdica, como Estados Unidos, Austrália e Europa. Predomina ligeiramente no sexo masculino, com maior incidência entre 40 e 60 anos (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

Mutações hereditárias de genes supressores de tumor estão fortemente associadas ao melanoma familiar, porém perfazem em torno de 10% de todo melanoma cutâneo (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

2.2.7.2 Principais subtipos

A maioria dos esquemas de classificação dos melanomas os divide em quatro subtipos, são divididos em:

- Lentigo maligno: apresenta prognóstico favorável, é uma mácula larga, desordenadamente pigmentada, usualmente desenvolve-se em pessoas idosas e é capaz de evoluir para melanoma “*in situ*” e invasivo;
- Melanoma extensivo superficial: ocorre principalmente em pacientes jovens, cresce lateralmente antes da invasão vertical e apresenta um prognóstico relativamente favorável;
- Melanoma nodular: geralmente apresenta-se como um nódulo pigmentado de crescimento rápido. Representa o tipo mais agressivo;

- Melanoma acral lentiginoso: possui características histológicas diferentes dos demais tipos, apresenta-se em extremidades e é mais frequente em pessoas com mais pigmentação. Tem baixa prevalência, porém é potencialmente agressivo.

O critério mais usado para o diagnóstico clínico do melanoma é baseado na assimetria (A), bordas irregulares (B), coloração desigual (C) e diâmetro maior que 6 mm (D) (conhecido como regra do ABCD). Porém, esse teste apresenta limitações quando aplicado em lesões recentes, que apresentam pigmentação relativamente homogênea, bordas regulares e diâmetro pequeno (menor que 5 mm) (LeBOIT et al., 2006).

Estudos demonstram que o número de melanócitos, sua morfologia e a distribuição pela pele são muito variáveis. É importante usar alguns critérios para a análise histopatológica dos melanomas, entre eles, a presença de ninhos e de disseminação pagetoide até os terços superiores do epitélio, enquanto que a distribuição irregular, confluência e atipia citológica não devem ser utilizadas de forma isolada para o diagnóstico dessas lesões (TAKANO; ABREU E LIMA, 2010).

A classificação histológica do melanoma é definida pela localização e/ou profundidade de envolvimento. Pode ser descrita como padrão de crescimento radial, no qual é confinado primariamente na epiderme, e como padrão de crescimento vertical caracterizando um padrão mais agressivo, no qual o tumor invade camadas mais profundas favorecendo metástases (Figura 7) (CHIN; MERLINO; DePINHO, 1998).

Figura 7 - Estágios da progressão histopatológica da transformação do melanócito. (A) Tecido normal. Observa-se a distribuição normal dos melanócitos dendríticos pela camada basal. (B) Proliferação benigna dos melanócitos. Os melanócitos estão organizados em ninhos uniformes compondo um nevo. (C) Displasia melanocítica. Observam-se irregulares pontes e ninhos melanocíticos atípicos em um nevo displásico. (D) Melanoma “*in situ*”, fase de crescimento radial (RPG). Observam-se células individuais em camada superior da epiderme. (E) Melanoma maligno, fase de crescimento vertical (VGP). CHIN; MERLINO; DePINHO (1998).

A progressão do melanoma pode ser descrita pelo modelo em que os melanócitos de lesões névicas podem se converter progressivamente em melanócitos de nevos displásicos, melanomas de crescimento radial, melanomas de crescimento vertical e em melanomas metastáticos, porém melanócitos imaturos poderiam originar qualquer uma das formas tumorais. Como a progressão tumoral não segue obrigatoriamente essas etapas, esse modelo proposto sugere a hipótese de que células-tronco tumorais seriam capazes de originar as diferentes fases de progressão desse tipo tumoral (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

Acredita-se que tumores com até 10^6 células, ou 1 mm^3 , possam se proliferar sem que haja a formação de novos vasos. Para que um tumor seja detectado clinicamente, a ordem de grandeza deve ser pelo menos 3 vezes maior do que esses valores. A expansão tumoral a níveis clinicamente detectáveis pressupõe necessariamente a infiltração do tumor por vasos neoformados. Os melanomas produzem diferentes polipeptídeos capazes de induzir a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos, que quando formados anastomosam com capilares já existentes, permitindo o influxo de nutrientes para a massa tumoral e o efluxo de

células tumorais para o organismo, facilitando a metastatização. Os vasos neoformados têm membranas basais incompletas, facilitando sua invasão por células tumorais (BELFORT; SCHMERLING, 2013).

Na maioria dos pacientes com doença metastática, geralmente os linfonodos regionais são afetados em primeiro lugar, porém metástases distantes podem ser observadas em pacientes que não apresentam acometimento dos linfonodos. A região mais comum de metástase é a pele, seguida pelos pulmões, fígado, sistema nervoso central e os ossos, porém qualquer órgão pode ser afetado (LeBOIT et al., 2006).

2.2.7.3 Tratamento

A excisão cirúrgica com ampla margem de segurança é o tratamento de escolha para melanomas primários, com a retirada do linfonodo sentinela, minimizando assim as chances de metástase. A radioterapia é apenas indicada para tumores inoperáveis, sendo uma técnica inferior à cirurgia. No caso de metástase, a radioterapia é usada de forma paliativa.

Algumas terapias adjuvantes, descritas na tabela 1, são utilizadas no tratamento do melanoma metastático, porém com pouco valor prognóstico (GARBE et al., 2008).

Droga	Dose	Taxa de resposta
Dacarbazina	250mg/m ² i.v. por 1-5 dias a cada 3 a 4 semanas 800 – 1200mg/m ² i.v. a cada 3 a 4 semanas	12,1 – 17,6% 5,3 – 23%
Temozolamida	150 – 200mg/m ² v.o. por 1-5 dias a cada 4 semanas	13,5 – 21%
Fotemustina	100 mg/m ² i.v. nos dias 1, 8 e 15 com intervalo de 5 dias e repetido por 3 semanas	7,4 – 24,2%
Vindesina	3 mg/m ² i.v. a cada 14 dias	12 – 26%
Interferon-alfa	9m–18m IU/m ² s.c. 3x/semana	13 – 25%
Interleucina-2	600 000 IU/kg i.v. por 1-5 dias a cada 8 horas, repetir ciclo após 14 dias	16 – 21,6%

Tabela 1 - Terapias adjuvantes para tratamento de melanoma metastático. Adaptado de (GARBE et al., 2008).

A poliquimioterapia apresenta taxas de remissão mais altas, quando comparada à monoquimioterapia, porém, sem aumentar a sobrevida, apresenta maior toxicidade e proporciona um tratamento eficaz para os sintomas causados pela metástase (GARBE et al., 2008).

Em geral, o melanoma tem baixa sensibilidade aos agentes citotóxicos e pode desenvolver o mecanismo de resistência a múltiplas drogas, o que dificulta a eficácia do tratamento (SERSA et al., 2008a).

O melanoma cutâneo foi considerado, por muito tempo, um tumor relativamente radiorresistente (DOSS; MEMULA, 1982). Estudos recentes demonstram que a resposta do tumor à radiação depende da taxa de dose utilizada (VONGTAMA et al., 2003).

As pesquisas *in vitro* e *in vivo* são necessárias para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e direcionados à célula tumoral, diminuindo os efeitos colaterais indesejáveis, melhorando a qualidade de vida e a sobrevida do paciente (CAMPOS, 2008).

Pesquisas com o uso de pulsos elétricos associados ao uso de quimioterápico (eletroquimioterapia) revelam boa eficácia para o tratamento de melanoma múltiplo inoperável, tornando a eletroquimioterapia uma alternativa de tratamento nesses casos (SNOJ et al., 2007).

2.3 ELETROPORAÇÃO

O fenômeno de eletroporação de membrana compreende uma técnica elétrica que torna lipídios e proteínas de membrana porosos e permeáveis, transitoriamente e reversivelmente, através de pulsos de tensão elétrica (JAROSZESKI et al., 2000). Os poros são gerados quando o campo elétrico induzido supera a diferença de potencial transmembrana (GOWRISHANKAR; WEAVER, 2006). Quando os valores de amplitude e duração dos pulsos elétricos excedem os padrões suportados pela membrana os poros se tornam irreversíveis, causando a morte celular (PUC et al., 2004).

Durante a aplicação de um campo elétrico as cargas ou dipolos elétricos das moléculas lipídicas são reorientados, enfraquecendo a barreira da bicamada lipídica contra íons, provocando um rearranjo das moléculas lipídicas e expandindo ou criando novos poros hidrofóbicos. A formação de um poro na membrana diminui a energia necessária para um íon ou molécula atravessar a bicamada lipídica. Ocorre um rearranjo dos dipolos formando um

conjunto de diferentes poros, se expandindo e aumentando consideravelmente a condutividade da membrana, que cai rapidamente após a interrupção do campo externo (TSONG, 1991).

A eletroporação tem um amplo espectro de aplicações nas áreas de biomédicas: amplamente utilizado em biologia molecular, biotecnologia e medicina. É possível a aplicação da técnica *in vitro* e *in vivo*. Pode ser utilizada para a entrega de genes e drogas às células (HELLER et al., 1996b, KANDUSER; SENTJURC; MIKLAVCIC, 2006).

2.3.1 Eletroquimioterapia

A eletroquimioterapia é uma nova abordagem terapêutica que favorece a entrega de drogas que não penetram facilmente nas células. É baseada na aplicação local de pulsos elétricos curtos e intensos que permeabilizam as células dos tecidos de forma transitória. Estudos *in vitro* demonstram claramente que a absorção da droga é aumentada por eletroporação da membrana plasmática. As drogas mais utilizadas nessa aplicação são a bleomicina e a cisplatina (CEMAZAR et al., 2008; ORLOWSKI; MIR, 1993).

É possível que outros mecanismos adicionais possam estar envolvidos na efetividade antitumoral da eletroquimioterapia. Um mecanismo possível pode ser as mudanças no fluxo de sangue do tumor induzido pela aplicação de pulsos elétricos. Quando o fluxo de sangue é reduzido, pode ocorrer hipóxia tecidual e maior exposição à droga (SERSA et al., 1999).

A aplicação de pulsos elétricos induz alterações no fluxo de sangue do tumor: que é aumentado ou diminuído, dependendo da amplitude do pulso. Na sequência de pulsos elétricos de alta amplitude, a redução do fluxo de sangue do tumor é rápida, com uma recuperação lenta ao longo de 24 horas de tratamento. A extensão da redução do fluxo de sangue do tumor está relacionada tanto ao número como à amplitude (superior a 640 V) dos pulsos elétricos. Em contraste, os pulsos elétricos de menor amplitude (menor que 640 V) aumentam o fluxo sanguíneo do tumor. A falta de resposta do tecido muscular normal, adjacente aos tumores, durante o tratamento com pulsos elétricos, sugere a ausência de qualquer alteração sistêmica no fluxo sanguíneo do tecido normal (SERSA et al., 1999).

O transporte da bleomicina através da membrana plasmática é mediado por proteínas carreadoras que internalizam, via endocitose, o fármaco. Em células tumorais, o número dessas proteínas membranares é menor. A aplicação de pulsos elétricos através do mecanismo

de eletroporação facilita o acesso direto da bleomicina ao citoplasma (MIR; ORLOWSKI, 1999).

Diversos trabalhos evidenciam a efetividade antitumoral da bleomicina quando potencializada por pulsos elétricos. É necessária uma dose menor da droga para produzir os efeitos citotóxicos desejáveis, o que leva a uma diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos do tratamento (GOTHELF; MIR; GEHL, 2003; MIKLAVCIC et al., 1998).

A cisplatina é transportada para o interior da célula por dois mecanismos, sendo eles a difusão passiva e o transporte por proteínas carreadoras. Como nas células tumorais a entrada de fármacos citotóxicos é limitada, a aplicação de pulsos elétricos favorece esta penetração, levando a um acúmulo citoplasmático do fármaco (figura 8) (SERSA et al., 2008a).

Figura 8- Princípio da eletroquimioterapia. Droga não-permeante ou mal permeante, com alvo intracelular, injetado sistemicamente ou intratumoral, circunda as células tumorais. Aplicação de pulsos elétricos provoca um aumento da permeabilidade da membrana, o que permite a entrada da droga anticancerígena nas células para exercer a sua ação citotóxica.

Fonte: Adaptado de SERSA et al. (2008a).

Embora existam diversos tipos de eletrodos no mercado, em princípio, dois tipos diferentes de eletrodos são utilizados de acordo com o tamanho e localização do tumor. A disposição dos eletrodos deve ser de tal maneira que proporcione a aplicação homogênea e constante dos pulsos elétricos no tecido (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008).

Eletrodos de placa são usados para o tratamento da pele ou lesões superficiais (Figura 9). A profundidade de penetração do campo elétrico efetivo é bastante pequena, e depende da distância entre os eletrodos; quanto maior a distância e a profundidade do campo elétrico, maior tensão deve ser aplicada entre dois eletrodos (SERSA et al., 2008a)

Eletrodos de agulha podem ser de dois tipos: agulhas posicionadas em duas filas paralelas ou em forma hexagonal. Em contraste com os eletrodos de placa, os eletrodos em agulha devem ser inseridos ao longo do tecido do tumor até a região mais profunda dele (SERSA et al., 2008a).

Figura 9 - Tipos de eletrodos, a distribuição de campo elétrico e aplicação de pulsos elétricos em tumores. Eletrodos de placa (esquerda) ou agulha (à direita) são utilizados de forma não invasiva e invasiva, respectivamente. A aplicação de pulsos elétricos de alta tensão por meio de eletrodos de placa apresenta uma distribuição do campo elétrico diferente em comparação com os eletrodos de agulha. Eletrodos de placa são mais apropriados para tumores na superfície, não situados profundamente no tecido. Eletrodos em agulha têm uma distribuição de campo elétrico, que é predominantemente limitada à região entre os eletrodos e para as pontas dos eletrodos, de modo que a agulha deva ser inserida por toda a profundidade do tumor. Em ambos os casos, os tumores maiores podem ser tratados através do reposicionamento dos eletrodos de modo que todo o volume tumoral é totalmente coberto por um campo elétrico suficientemente elevado (SERSA et al., 2008a).

2.3.1.1 Limitações da eletroquimioterapia

A eletroquimioterapia é um tratamento local, que tem sido usado principalmente quando outras modalidades de controle local do tumor falham. A sua principal desvantagem é que não pode ser usado para o tratamento de tumores profundos. Além disso, há uma falta de estudos comparativos com outros tratamentos locais, tais como a radioterapia e perfusão isolada, a qual deve, obviamente, ser iniciada. Por razões de segurança, a eletroquimioterapia não é recomendada em pacientes com marca-passos cardíacos e pacientes em terapia anticoagulante (SERSA et al., 2008a).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Este projeto visa estudar os efeitos da eletroquimioterapia em melanoma B16F10 transplantado em camundongos, associado a uma nova proposta de terapia para contribuir no controle e regressão tumoral.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a resposta clínica e a sobrevida dos animais tratados com eletroquimioterapia, assim como o crescimento do melanoma B16, através de exames físicos e mensurações periódicas do volume tumoral.

Realizar estudo histopatológico dos tumores nos camundongos, para observar a histologia e o número de mitoses no tecido.

Através da técnica de imunoistoquímica com marcadores 1A4 e Triptase, analisar a angiogênese no melanoma B16.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O melanoma murino da linhagem B16F10 foi escolhido neste trabalho por ser um modelo biológico extensivamente pesquisado por diversos autores (BICEK et al., 2007; SERSA et al., 1994; SERSA et al., 2008a), por apresentar características semelhantes ao melanoma humano e por possuir o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Paulista (UNIP), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo (protocolo nº 155/13 CEP/ICS/UNIP).

Foi realizado, inicialmente, um ensaio para validar o aparelho a ser utilizado em eletroquimioterapia e a técnica a ser utilizada. Foram utilizados 20 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 8 semanas de vida, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Paulista e acondicionados durante todo o experimento em caixas de polipropileno coletivas em temperatura e ventilação controladas, com ciclo de luz 12/12 horas, ingestão de ração e água “*ad libitum*”.

Num segundo momento do experimento foram utilizados 60 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 8 semanas de vida, provenientes do biotério da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), os animais foram mantidos no biotério da Universidade Paulista e acondicionados durante todo o experimento em caixas de polipropileno coletivas em temperatura e ventilação controladas, com ciclo de luz 12/12 horas, ingestão de ração e água “*ad libitum*”.

Todos os animais foram pesados diariamente.

4.1 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Cultura de células

As células de melanoma B16 apresentam baixo potencial metastático. Foram obtidas a partir de linhagens de melanoma murino B16F10 (STAQUICINI et al., 2003).

Foi realizado o cultivo em meio completo (RPMI, 10 % de SBF) a uma temperatura de 37 °C em atmosfera de umidade 5% de CO₂. As células foram desaderidas com PBS-EDTA e posteriormente cultivadas em garrafas de cultura. Após o experimento as células foram congeladas em freezer a -70 °C ou em nitrogênio líquido, em tubos de congelamento contendo $1-2 \times 10^6$ células em 1 mL de meio de congelamento (90 % de SBF e 10 % de DMSO).

4.1.2 Inoculação do melanoma

Um total de 2×10^5 células de melanoma B16F10 cultivadas conforme citado foram inoculadas no dorso direito dos camundongos C57BL/6. O volume do tumor foi mensurado diariamente com paquímetro (comprimento x largura), para acompanhar o crescimento tumoral.

Os camundongos foram eutanasiados quando o tumor atingiu 20mm em ambas as medidas, ou menos se o tumor estivesse impedindo a locomoção (valores estabelecidos pela prática laboratorial).

4.1.3 Aparelho de eletroporação

No Laboratório do Acelerador Linear do Instituto de Física da Universidade de São Paulo foi desenvolvido pelo grupo um aparelho gerador de oito pulsos elétricos de 1000 volts com duração de 100 μ s e frequência regulável de 1Hz ou 5kHz (figuras 10 e 11). Na figura 14 apresenta-se o esquema do circuito do gerador de pulsos elétricos.

Para o ensaio inicial foi desenvolvido um eletrodo constituído por duas placas de aço inoxidável de 30 mm de comprimento dispostas em paralelo com 10 mm de distância entre elas (figura 12); e a frequência utilizada foi de 1 Hz.

Para o segundo ensaio foi desenvolvido um eletrodo constituído por duas placas de aço inoxidável de 30 mm de comprimento dispostas em paralelo com distância regulável entre elas variando de 2 mm a 10 mm (figura 13); e a frequência utilizada foi de 1 Hz.

Figura 10 – Vista frontal do eletroporador desenvolvido pelo grupo. O botão de ligar e desligar o aparelho é a 1ª chave da direita, 2ª chave serve para regular a frequência (1 Hz e 5kHz) e pedal para acionar os pulsos elétricos.

Figura 11 – Vista traseira do aparelho eletroporador desenvolvido pelo grupo. Da direita para esquerda: saída do pedal de acionamento dos pulsos, adaptador para o cabo do eletrodo, fusível do circuito e cabo de energia.

Figura 12 – Primeiro eletrodo fabricado pelo grupo, e cabo de conexão com o eletroporador. Eletrodo de placa com distância fixa entre elas de 1 cm.

Figura 13 - Segundo eletrodo fabricado pelo grupo, e cabo de conexão com o eletroporador. Eletrodo de placa com distância regulável entre 0,1 e 1 cm.

Figura 14 – Circuito do gerador de pulsos do eletroporador desenvolvido pelo grupo.

4.1.4 Grupos experimentais

Os animais foram separados em 16 grupos com 5 animais cada, divididos em:

1. Controle dos grupos 2 ao 4;
2. Experimental tratado com uma aplicação de Bleomicina;
3. Experimental tratado com uma aplicação de eletroporação;
4. Experimental tratado com uma aplicação de eletroporação associada ao uso do quimioterápico Bleomicina (eletroquimioterapia);
5. Experimental tratado com duas aplicações de eletroporação associada ao uso do quimioterápico Bleomicina (eletroquimioterapia) (eutanasiado quando o tumor atingiu 20 mm em ambas as medidas);
6. Controle do grupo 5
7. Experimental tratado com uma aplicação de eletroporação (eutanasiado 3 dias após aplicação, para análise de angiogênese);
8. Experimental tratado com uma aplicação de Bleomicina (eutanasiado 3 dias após aplicação, para análise de angiogênese);
9. Experimental tratado com uma aplicação de eletroporação associada ao uso do quimioterápico Bleomicina (eletroquimioterapia) (eutanasiado 3 dias após aplicação, para análise de angiogênese);
10. Experimental tratado com duas aplicações de eletroporação (eutanasiado 3 dias após última aplicação, para análise de angiogênese);
11. Experimental tratado com duas aplicações de Bleomicina (eutanasiado 3 dias após última aplicação, para análise de angiogênese);
12. Experimental tratado com duas aplicações de eletroporação associada ao uso do quimioterápico Bleomicina (eletroquimioterapia) (eutanasiado 3 dias após última aplicação, para análise de angiogênese);
13. Controle do grupo 7
14. Controle do grupo 8 e 9
15. Controle do grupo 10
16. Controle do grupo 11 e 12

Todos os animais foram pesados diariamente e após a inoculação do tumor seu crescimento foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital (Jomarca, Guarulhos, SP., Brasil).

4.1.5 Tratamento dos grupos

Os animais foram acondicionados durante todo o experimento em caixas de polipropileno coletivas em temperatura e ventilação controladas, com ciclo de luz 12/12 horas, ingestão de ração e água “*ad libitum*”. Os animais foram pesados e o crescimento tumoral foi avaliado diariamente. O tratamento dos grupos 1 ao 4 foi realizado quando o tumor atingiu 10 mm em ambas as medidas e o tratamento dos grupos 5 ao 16 foi realizado quando o tumor atingiu 5 mm em ambas as medidas. Estipulou-se o dia 0 como sendo o dia do tratamento.

No momento do tratamento todos os animais foram anestesiados com 90 – 120 mg/kg de Cetamina associado a 5 - 16 mg/kg de Xilazina intra-peritoneal.

Descrição do tratamento dos animais de cada grupo:

Grupo 1 (controle): foi aplicado 0,16 ml de solução fisiológica 0,9% intratumoral;

Grupo 2 (Bleomicina): foi injetado 0,16 ml de Bleomicina (15 mg/ 5ml) intratumoral;

Grupo 3 (eletroporação): foi aplicado 0,16 ml de solução fisiológica 0,9% intratumoral e em seguida foi realizada a aplicação de 8 pulsos elétricos de 1000 volts com duração de 100 μ s e 1 Hz de frequência. Os eletrodos foram colocados em lados opostos do tumor e foi usado um gel condutor para manter bom contato com a pele.

Grupo 4 (eletroquimioterapia): foi administrado 0,16 ml de Bleomicina intratumoral 5 minutos antes de receberem os pulsos elétricos (SATKAUSKAS et al., 2005).

Grupo 5 (2 aplicações de eletroquimioterapia): foi administrado 0,16 ml de Bleomicina intratumoral 5 minutos antes de receberem os pulsos elétricos e após 3 dias foi repetido o mesmo tratamento. Adotou-se o mesmo critério de eutanásia dos grupos anteriores;

Grupo 6 (controle – 2 aplicações eletroquimioterapia): foi aplicado 0,16 ml de solução fisiológica 0,9% intratumoral, após 3 dias repetiu-se o mesmo tratamento e os animais foram eutanasiados quando o tumor atingiu 20 mm em ambas as medidas;

Grupo 7 (1 aplicação eletroporação – angiogênese): aplicou-se 0,16 ml de solução fisiológica 0,9% intratumoral e em seguida realizou-se a aplicação de 8 pulsos elétricos de 1000 volts com duração de 100 μ s e 1 Hz de frequência. Os animais foram eutanasiados 3 dias após o tratamento para a análise de angiogênese;

Grupo 8 (1 aplicação Bleomicina - angiogênese): foi injetado 0,16 ml de Bleomicina intratumoral e os animais foram eutanasiados 3 dias após o tratamento para a análise de angiogênese;

Grupo 9 (1 aplicação eletroquimioterapia - angiogênese): foi aplicado 0,16 ml de Bleomicina intratumoral 5 minutos antes de receberem 8 pulsos elétricos de 1000 volts com duração de 100 μ s e 1 Hz de frequência. Esses animais foram eutanasiados 3 dias após o tratamento;

Grupo 10 (2 aplicações eletroporação – angiogênese): aplicou-se 0,16 ml de solução fisiológica 0,9% intratumoral e em seguida foi realizada a aplicação de 8 pulsos elétricos de 1000 volts com duração de 100 μ s e 1 Hz de frequência; após 3 dias o tratamento foi repetido. Os animais foram eutanasiados 3 dias após o segundo tratamento para a análise de angiogênese;

Grupo 11 (2 aplicações Bleomicina - angiogênese): foi injetado 0,16 ml de Bleomicina intratumoral e após 3 dias foi repetido o tratamento e os animais foram eutanasiados 3 dias após o segundo tratamento;

Grupo 12 (2 aplicações eletroquimioterapia - angiogênese): foi administrado 0,16 ml de Bleomicina intratumoral 5 minutos antes de receberem 8 pulsos elétricos de 1000 volts com duração de 100 μ s e 1 Hz de frequência e após 3 dias foi repetido o tratamento. Esses animais foram eutanasiados 3 dias após o segundo tratamento;

Grupo 13 (controle grupo 7): os animais foram anestesiados quando o tumor atingiu tamanho para tratamento e foram eutanasiados após 3 dias.

Grupo 14 (controle grupo 8 e 9): foi aplicado 0,16 ml de solução fisiológica 0,9% intratumoral e os animais foram eutanasiados 3 dias após o tratamento para a análise de angiogênese;

Grupo 15 (controle grupo 10): os animais foram anestesiados quando o tumor atingiu tamanho para tratamento e após 3 dias foi repetido o mesmo procedimento. Foram eutanasiados após 3 dias do último procedimento;

Grupo 16 (controle grupo 11 e 12): foi aplicado 0,16 ml de solução fisiológica 0,9% intratumoral e após 3 dias o tratamento foi repetido e os animais foram eutanasiados 3 dias após o segundo tratamento para a análise de angiogênese;

4.1.6 Eutanásia e necropsia

Os animais foram anestesiados com Cetamina associada a Xilazina por via intraperitoneal. A eutanásia dos animais foi realizada aprofundando o plano anestésico até obter a parada cardio-respiratória.

Em seguida foi realizada a necropsia, e procedeu-se à inspeção externa e cavitária.

Para a análise histopatológica foram retirados os tumores dos animais dos grupos 1 ao 16 e armazenados em formol a 10%.

Para a análise de angiogênese os tumores dos animais dos grupos 7 ao 16 foram armazenados em formol a 10%. Utilizou-se os marcadores 1A4 para microvasos e anticorpo Triptase para a marcação de mastócitos.

4.1.7 Análise Histopatológica

As amostras foram submetidas às técnicas rotineiras de parafinação, corte em 5µm e coloração por hematoxilina-eosina. A análise do material foi realizada por microscopia óptica.

Foi analisado o padrão do tecido e realizada a contagem de figuras de mitoses de cada caso, contadas em 10 campos com aumento de 40 vezes.

Essa etapa foi realizada no laboratório de patologia animal Vetpat em Campinas.

4.1.8 Análise imunoistoquímica

Para a avaliação imunoistoquímica foi empregado o seguinte protocolo com as lâminas:

a. Imersão em solução de 70 ml de metanol e 30 ml de peróxido de hidrogênio 30 volumes, durante 15 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos, seguida de duas lavagens de 5 minutos em PBS.

b. Recuperação antigênica em calor úmido $\pm 90^{\circ}\text{C}$ (Steam Cuisine 700 Hi Speed – T-Fal®) (T-Fal, West Orange, NJ., Estados Unidos da América) durante 20 minutos.

- c. Esfriamento em temperatura ambiente, por no mínimo 20 minutos, seguido de duas lavagens de 5 minutos em PBS.
- d. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado através da incubação das lâminas em leite em pó Molico® (5%) (Nestlé Brasil Ltda, São Paulo, SP., Brasil) diluído em PBS, durante 25 minutos.
- e. Incubação, *overnight*, com anticorpo primário (1A4, Dako® - 1:100 ou Triptase, Dako® - 1:200) (Dako do Brasil Ltda, Sumarezinho, Sp., Brasil) diluído em PBS, seguida de duas lavagens de 5 minutos em PBS.
- f. Incubação, durante 30 minutos, com anticorpo secundário Goat anti Mouse Biotinilado (1:100) diluído em PBS, seguida de duas lavagens de 5 minutos em PBS.
- g. Amplificação e acentuação da reação: Avidina-Biotina peroxidase -ABC (segundo recomendações do Kit – ABC – Horseradish Peroxidase - Dako®) por 30 minutos, seguida de duas lavagens de 5 minutos em PBS.
- h. Diaminobenzidina - DAB (segundo recomendações do Kit – DAB Reagent Set KPL®) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD., Estados Unidos da América), de 5-8 minutos.
- i. Lavagem em água corrente.
- j. Coloração de fundo com Hematoxilina de Harris diluída 1:2 em água destilada por 1 minuto.
- k. Lavagem em água corrente para retirada do excesso de corante.
- l. Desidratação e montagem com lamínula em Entellan® (MERK S.A, Billerica, MA, Estados Unidos da América).

A média de microvasos foi feita através da identificação de microvasos marcados pelo anticorpo 1A4, em que foi realizada a contagem de 5 campos de 400 vezes por lâmina, com retículo de 10 x 10 mm e posterior média.

A média de mastócitos foi feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase, em que foi realizada a contagem das células positivas em 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10 mm e posterior média.

Essa etapa foi realizada no laboratório de patologia animal Vetpat em Campinas.

4.1.9 Cálculo do volume tumoral

Para o cálculo do volume tumoral foi utilizada a fórmula (STEEL, 1977):

$$V(\text{mm}^3) = (d^2 \times D/2)$$

Onde d e D são os diâmetros menor e maior, respectivamente.

4.1.10 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir do cálculo do volume tumoral foram submetidos a um teste de Comparações Múltiplas entre os diversos grupos experimentais. Observou-se uma dispersão dos resultados obtidos com o volume tumoral dos grupos. Devido à isso, foram realizados três estudos estatísticos, sendo dois não paramétricos e um paramétrico, para a confirmação dos resultados obtidos.

O teste paramétrico utilizado foi o *T-Student* do programa XLSTAT versão 2014.4.09. E os testes não paramétricos foram o *Kruskal-Wallis* do programa *Action* 3.0.2 para a análise de múltiplos grupos e o teste de *Mann-Whitney* do programa XLSTAT versão 2014.4.09 para a análise comparativa entre os grupos controle e experimental. Em todos os casos, fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se os valores significantes.

Para a análise de sobrevivência foi utilizada a curva de *Kaplan-Meier* e os testes *LogRank*, *Breslow* e *Tarone-Ware* do programa IBM SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram divididos em 4 partes de acordo com os grupos.

Primeira: Volume do tumor e sobrevida dos animais dos grupos 1 ao 6;

Segunda: Volume do tumor dos animais dos grupos 7 ao 16;

Terceira: Número de mitoses observadas nos tumores dos animais dos grupos 1 ao 16.

Quarta: Análise de angiogênese através de técnicas de imunoistoquímica dos animais dos grupos 7 ao 16;

5.1 VOLUME DO TUMOR E SOBREVIDA DOS GRUPOS 1 AO 6

Serão apresentados os resultados do volume tumoral e o tempo de sobrevida obtidos com os animais dos grupos 1 ao 6, os quais foram mantidos vivos até o tumor atingir o volume máximo proposto.

5.1.1 Grupo 1 (controle dos grupos 2, 3 e 4)

O grupo 1 representa os animais de controle dos grupos 2 ao 4. Desse grupo foram tratados 4 animais. Antes do tratamento foi realizada a eutanásia do animal 4, pois este apresentava-se com prostração severa, incompatível com a qualidade de vida. Devido a isso, os resultados apresentados para esse grupo correspondem ao cálculo do volume tumoral dos animais 1, 2, 3 e 5.

Os resultados obtidos estão na tabela 2. Observou-se que:

1. Houve um crescimento rápido e progressivo do tumor de todos os animais desse grupo;
2. O tempo maior de sobrevida após o tratamento foi de 15 dias, em que apenas o animal 3 sobreviveu;
3. A média de sobrevida dos animais analisados foi de 8,75 (± 5) dias;

4. Os animais 1, 3 e 5 foram eutanasiados quando o tumor atingiu 20 mm em ambas as medidas. O animal 2 teve morte espontânea.

Grupo 1					
Dias de tratamento	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	863,75	661,5	522,72	Eutanásia	988,7
1	922,16	798,8	667,83		1191
3	1554,0	1440			
4	1820,77	Óbito	1691,5		1766
6			1745,3		
7	3188,45				3501
9	4839,1		2369,4		Eutanásia
10	4997,46				
12	Eutanásia		3438,8		
15			5938,6		
			Eutanásia		

Tabela 2 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 1 (controle). A1 ao A5 referem-se aos animais do grupo.

5.1.2 Grupo 2 (Bleomicina)

O grupo 2 corresponde aos animais tratados com o quimioterápico Bleomicina. Neste grupo, o animal 3 apresentou óbito antes de ser tratado, sendo excluído das análises. Os resultados obtidos para os animais 1, 2, 4 e 5 estão na tabela 3.

A média de sobrevida dos animais analisados foi de 7,5 ($\pm$ 8,35) dias, sendo que, o animal 2 apresentou sobrevida muito superior, de 20 dias, comparativamente aos animais do mesmo grupo que apresentaram sobrevida de 3 a 4 dias após o tratamento. Devido ao resultado obtido com o animal 2 a dispersão da média (7,5 dias) resultou-se bem alta.

Os animais tiveram morte espontânea com exceção do animal 2, que foi eutanasiado.

Grupo 2					
Dias de tratamento	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	502,5	670,43	Óbito	500	527,3
1	623,78			642,77	
3	955,3	805,95		1560,3	
4	Óbito	971,76		Óbito	882,9
6		1451,3			Óbito
12		2406,2			
20		4398,6			
	Eutanásia				

Tabela 3 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 2 (Bleomicina).

5.1.3 Grupo 3 (eletroporação)

Foram tratados com eletroporação os 5 animais desse grupo. Os resultados obtidos estão na tabela 4.

A média de sobrevida foi de 7,2 ($\pm$ 6,26) dias. Os animais 2 e 5 tiveram sobrevida de 14 dias, os animais 1 e 3 apresentaram sobrevida de 2 dias e o animal 4, sobrevida de 4 dias.

Os animais 2 e 5 foram eutanasiados e os animais 1, 3 e 4 tiveram morte espontânea.

Grupo 3					
Dias de tratamento	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	500	627,61	645,12	459,34	835,9
1	611,99	1065,1	853,16	965,54	1128
2	954,81		1377,4		
4	Óbito		Óbito	1860,3	1676
6		1436,1		Óbito	2252
7		2141,9			2810
10					4190
14		5671,2			8620
	Eutanásia				Eutanásia

Tabela 4 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 3 (eletroporação) de acordo com os dias de tratamento.

5.1.4 Grupo 4 (eletroquimioterapia – 1 aplicação)

Neste grupo, os animais foram tratados com eletroporação associada a aplicação do quimioterápico Bleomicina. Deste grupo, apenas os animais 2 e 5 foram tratados. Foi realizada a eutanásia do animal 4 antes que o tumor atingisse 10 mm, pois apresentava apatia severa, dificuldade de locomoção e tremores. Não foi observado crescimento tumoral no animal 3 e o animal 1 veio a óbito no dia do tratamento devido à anestesia.

Este grupo de animais apresentou média de sobrevida de 20 dias, ambos os animais analisados apresentaram a mesma sobrevida. O animal 2 teve morte espontânea e o animal 5 foi eutanasiado.

Os resultados do cálculo do volume tumoral estão na tabela 5.

Grupo 4					
Dias de tratamento	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	Morreu na anestesia	500	Não cresceu	Eutanásia	600
1		598,31			652,52
3		420,67			654,65
7		702,09			1298,83
11		1104,5			1868,3
14		1579			2623,77
15		1843,2			3038,77
20		2075,9			4471,73
		Óbito			Eutanásia

Tabela 5 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 4 (eletroquimioterapia) de acordo com os dias de tratamento.

5.1.5 Grupo 5 (eletroquimioterapia - 2 aplicações)

Os animais desse grupo foram tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia com intervalo de 3 dias entre as aplicações. Foram tratados os 5 animais desse grupo. Os resultados obtidos estão na tabela 6.

Dias de tratamento	Volume do tumor (mm ³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	184,30	89,82	60,60	109,37	49,28
4	176,48	101,04	0,00	67,27	49,30
6	70,21	33,46	0,00	0,00	0,00
8	128,62	58,14	0,00	0,00	0,00
12	157,46	58,74	0,00	0,00	62,00
16	292,03	386,91	47,19	25,19	155,47
21	Óbito	1725,80	54,85	231,32	228,21
24		2405,96	112,10	1374,00	324,21
28		8165,63	294,33	2378,19	714,01
36		Eutanásia	904,36	8281,25	1509,11
47			6568,01	Eutanásia	7425,00
			Eutanásia		Eutanásia

Tabela 6 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 5 (duas aplicações de eletroquimioterapia) de acordo com os dias de tratamento.

Observa-se que houve regressão progressiva do volume tumoral a partir da primeira aplicação, chegando à remissão completa em 3 dos 5 animais tratados, representando 60% dos animais tratados e remissão parcial em 40%; essa remissão se manteve em dois animais até 12 dias após a primeira aplicação, em que observou-se retorno do crescimento tumoral em todos os animais tratados. Nota-se que os animais desse grupo apresentaram excelente resposta ao tratamento. Em estudo realizado com melanoma metastático em humanos tratados com eletroquimioterapia observa-se 72 % de resposta completa, 5 % de resposta parcial, 18 % sem qualquer alteração e 5 % de progressão da doença durante um período superior a 12 semanas (BYRNE et al., 2005).

A média de sobrevida observada foi de 35,8 ($\pm$ 11,5) dias, os animais 3 e 5 tiveram sobrevida de 47 dias, o animal 4 apresentou sobrevida de 36 dias, o animal 2, sobrevida de 28 dias e o animal 1 teve sobrevida de 21 dias. Os resultados apresentados são semelhantes aos encontrados em literatura, estudos revelam média de sobrevida de 47 ± 5 dias e remissão semelhante (ENTIN et al., 2003); observa-se que o tratamento com eletroquimioterapia aumenta a sobrevida de animais tratados comparativamente aos animais controle (SERSA et al., 1999).

Os animais 2 a 5 foram eutanasiados e o animal 1 teve morte espontânea.

As figuras de 15 a 18 retratam os animais do grupo 5: animal 5 no 6º dia após o primeiro tratamento, animal 2 no 6º dia após o primeiro tratamento, animal 3 no 6º dia após o primeiro tratamento e animal 2 no 12º dia após o primeiro tratamento, respectivamente.

Figura 15 – Fotografia do animal 5 do grupo 5 no sexto dia após primeiro tratamento.

Figura 16 – Fotografia do animal 2 do grupo 5 no sexto dia após primeiro tratamento.

Figura 17 – Fotografia do animal 3 do grupo 5 no sexto dia após primeiro tratamento.

Figura 18 – Fotografia do animal 2 do grupo 5 no décimo segundo dia após primeiro tratamento.

Nas figuras 16 e 18 observa-se a presença de lesão ulcerada causada pelo tratamento com eletroquimioterapia, essa característica é descrita em outros experimentos como processo inflamatório induzido pelo tratamento, levando ao aparecimento de lesões ulceradas por alguns dias até a regressão tumoral (MIR et al., 1997).

5.1.6 Grupo 6 (controle grupo 5)

Foram tratados os 5 animais desse grupo. Os resultados obtidos estão na tabela 7.

G6					
Dias de tratamento	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	207,22	236,67	67,93	56,93	261,12
4	1324,22	1754,54	409,12	788,34	3701,37
6	-	Óbito	439,41	1547,61	6807,34
8	6586,39		587,32	2936,07	8454,29
12	Eutanásia		6348,00	7320,40	Eutanásia
				Eutanásia	

Tabela 7 - Resultados do cálculo do volume tumoral nos animais do grupo 6 (controle do grupo 5) de acordo com os dias de tratamento.

Observou-se crescimento tumoral progressivo em todos os animais desse grupo. A média de sobrevida foi de 8,8 ($\pm 3,35$) dias, os animais 3 e 4 tiveram sobrevida de 12 dias, os animais 1 e 5 apresentaram sobrevida de 8 dias, o animal 2, sobrevida de 4 dias.

Os animais 1, 3, 4 e 5 foram eutanasiados e o animal 2 teve morte espontânea.

As figuras a seguir mostram os animais do grupo 6. Na figura 19 observamos o animal 1 no 8º dia, na figura 20 observamos o animal 5 no 8º e na figura 21 temos o animal 4 no 12º dia. A figura 22 compara o animal do grupo 5 com o animal do grupo 6 no mesmo dia após tratamento.

Figura 19 – Animal 1 do grupo 6 no oitavo dia.

Figura 20 - Animal 5 do grupo 6 no oitavo dia.

Figura 21 - Animal 4 do grupo 6 no décimo segundo dia.

Figura 22 – Em A, imagem do animal 3 do grupo tratado no 12º dia após tratamento. Em B, imagem do animal 4 do grupo controle referente ao mesmo dia após o tratamento.

5.1.7 Resultados dos grupos

A figura 23 exibe as médias dos volumes tumorais obtidas de todos os animais dos grupos 1 ao 4, em função dos dias após o tratamento. A barra representa o erro da média (dispersão da média) do volume tumoral de cada grupo. Observa-se que:

1. No grupo 4, ocorreu atenuação do crescimento tumoral em comparação aos demais grupos. No intervalo de 3 – 15 dias a taxa média de crescimento tumoral foi de 363 mm³/dia e 167 mm³/dia nos grupos 1 e 4, respectivamente. A resposta ao tratamento com uma aplicação de eletroquimioterapia (grupo 4) mostrou-se eficaz em diminuir a velocidade de progressão tumoral comparativamente ao controle (grupo 1) porém, não resultou em regressão do volume do tumor.
2. Os animais do grupo 4 tiveram o volume tumoral menor quando comparado aos animais dos demais grupos. Observa-se que o volume tumoral do grupo 4 manteve-se de 3 a 4 vezes menor que o volume tumoral do grupo controle;
3. Quatorze dias após o tratamento os resultados apresentaram diferença significativa, com valor $p = 0,042$ entre os animais do grupo 3 e 4. A eletroquimioterapia atrasa o crescimento tumoral e com isso, aumenta a sobrevida;
4. Não houve diferença significativa no volume tumoral dos animais dos grupos 2 e 3 com os animais do grupo de controle. Indica que uma aplicação de Bleomicina e eletroporação não afeta a progressão do tumor.

Figura 23 - Média do volume tumoral e a dispersão da média dos animais tratados. Grupo 1 (controle); grupo 2, tratados com Bleomicina; grupo 3, tratado com eletroporação; e grupo 4, tratados com uma aplicação de eletroquimioterapia. Os seguimentos conectando os pontos dos grupos 1 e 4 servem tão somente para destacar o conjunto de dados.

Apesar de não ocorrer remissão parcial ou completa do tumor, observa-se que o crescimento tumoral dos animais do grupo tratado com eletroquimioterapia foi lento quando comparado aos demais grupos. Sabe-se que o diagnóstico precoce do melanoma influencia em grande proporção o índice de remissão tumoral (LeBOIT et al., 2006). O tratamento dos animais foi realizado quando o tumor atingiu 10 mm em ambas as medidas. Acredita-se que houve influência do grande volume tumoral na sua remissão; dessa forma, optou-se por tratar os animais dos grupos 5 quando estes apresentaram um tumor de 5 mm em ambas as medidas e os animais do grupo 6 foram mantidos como controle do grupo 5.

Na figura 24 exibe-se a média do volume tumoral dos animais dos grupos tratados e seus controles. Com o propósito de melhorar a estatística obteve-se a média entre os grupos 5 e 12, ambos tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia, e a média entre os grupos 6 e 16 pertencentes aos grupos controle, de acordo com os dias após o tratamento. A barra representa o erro da média (dispersão) do volume tumoral de cada grupo.

Figura 24 - Média do volume tumoral e o erro da média (dispersão) dos animais dos grupos 5 e 12 (tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia) e dos grupos 6 e 16 (controles). As curvas representam o polinômio de 3ª ordem ajustado aos dados dos grupos 5 e 12 com $R^2 = 0,982$ e polinômio de 2ª ordem ajustado aos dados dos grupos 6 e 16 com $R^2 = 0,997$.

Observa-se que:

1. Após o primeiro dia de tratamento houve redução de 16, 141, 89 e 122 vezes do volume tumoral dos animais tratados comparativamente aos animais controle para os dias 4, 6, 8 e 12, respectivamente. A partir do 16º dia após o tratamento o volume tumoral retomou o crescimento. Mais especificamente, observa-se uma clara “inflexão” (alteração de tendência) dos resultados entre 18 e 20 dias para os grupos 5 + 12.
2. Os animais do grupo tratado apresentaram sobrevida 4,3 vezes maior que os animais do grupo controle;
3. A partir do dia inicial do tratamento ocorreu aumento progressivo do volume tumoral nos animais dos grupos de controle.
4. O volume tumoral seguiu um padrão de crescimento, tanto para os grupos 6 + 16 quanto para os grupos 5 + 12 (muito inferior). Observa-se que a curva polinomial ajustou todos os dados, com coeficiente de determinação alto, significando que

98,2% dos dados dos grupos 5 + 12 são explicados pelos regressores presentes no modelo, e 99,7% dos dados dos grupos 6 + 16 são explicados pelo modelo. Através da curva consegue-se estimar valores de volume tumoral, em dias não experimentalmente aferidos no intervalo de tempo analisado.

A tabela 8 representa os valores médios do volume tumoral com seus respectivos erros da média e valor p das análises estatísticas realizadas com os resultados obtidos para os animais dos grupos 5 e 12 e dos grupos de controle 6 e 16.

Observa-se que ocorreu diferença significativa entre os grupos tratados e controles nos dias 4, 6, 8 e 12.

Grupo 5 e 12			Grupo 6 e 16		T-Student	Mann-Whitney
Dias	Volume (mm³)	Erro	Volume (mm³)	Erro	Valor p	Valor p
0	90,40	13,75	164,70	31,55	0,0539	0,055
4	67,43	16,44	1099,21	364,14	0,0220*	0,000*
6	20,73	13,96	2931,46	1964,17	0,2766	0,032*
8	34,44	17,42	3071,30	1032,80	0,0217*	0,000*
12	55,64	28,82	6834,20	486,20	0,0449*	0,079
16	181,36	69,84				
21	560,05	390,77				
24	1054,07	528,36				
28	2888,04	1815,82				
36	3564,90	2364,63				
47	6996,51	428,50				

Tabela 8 - Média do volume tumoral entre os grupos 5 e 12, entre os grupos 6 e 16, com os erros da média e os testes estatísticos com seu valor p.

A figura 25 exibe a média de sobrevida obtida entre os animais dos grupos 1 ao 4.

Observa-se diferença significativa de sobrevida entre o grupo 4 (eletroquimioterapia) e os demais grupos, e não observou-se diferença entre os grupos controle (1), Bleomicina (2) e eletroporação (3). O tratamento com uma aplicação de Bleomicina e uma aplicação de eletroporação não interferiu na média de sobrevida, enquanto que, o tratamento com uma aplicação de eletroquimioterapia resultou em sobrevida 2,3 vezes maior comparativamente ao controle.

Figura 25 – Média de sobrevida dos 4 grupos tratados em função dos dias. G1 representa o grupo controle, G2 o grupo tratado com Bleomicina, G3 o grupo tratado com eletroporação e G4, os animais tratados com eletroquimioterapia. Com valores em *T-Student* de $p = 0,808$ entre os grupos 1 e 2, $p = 0,694$ entre os grupos 1 e 3, $p = 0,021$ entre os grupos 1 e 4, $p = 0,955$ entre os grupos 2 e 3, $p = 0,029$ entre os grupos 2 e 4 e $p = 0,010$ entre os grupos 3 e 4.

A figura 26 representa a média de sobrevida dos animais dos grupos 5 e 6. Observa-se sobrevida 4 vezes maior no grupo tratado com duas aplicações de eletroquimioterapia em comparação com seu controle.

Figura 26 - Média de sobrevida dos grupos 5 e 6 em função dos dias. G5 representa o grupo tratado com duas aplicações de eletroquimioterapia e G6, o grupo controle. Diferença significativa com valor $p = 0,0048$.

Na figura 27, observa-se a curva de sobrevivência *Kaplan-Meier* dos animais dos grupos 1 ao 6. Nota-se que os animais dos grupos controle (grupo 1 e 6), os animais tratados apenas com Bleomicina (grupo 2) e os animais tratados com eletroporação (grupo 3) apresentaram curva de sobrevivência semelhante.

Nos animais do grupo 4, tratados com uma aplicação de eletroquimioterapia, não observa-se diferença na data final de sobrevivência, porém nota-se que, enquanto os grupos 1 ao 3 apresentaram diminuição da taxa de sobrevivência em função do tempo, os animais do grupo 4 não apresentaram essa diminuição, o que mostra que todos os animais desse grupo apresentaram óbito no mesmo intervalo de tempo.

A curva de sobrevivência dos animais tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia (grupo 5) mostrou diminuição de 20% concomitante aos animais do grupo 4, porém apresentaram maior taxa de sobrevivência que os demais grupos.

Figura 27 – Curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* dos animais dos grupos 1 ao 6. Testes de comparações globais de *LogRank* $p = 0,002$, *Breslow* $p = 0,014$ e *Tarone-Ware* $p = 0,06$.

Observa-se nesse experimento que os animais tratados com uma e duas aplicações de eletroquimioterapia apresentaram sobrevida maior em relação aos animais dos demais grupos. Sabe-se que a poliquimioterapia não aumenta a sobrevida dos indivíduos (GARBE et al., 2008), sugerindo que a introdução de pulsos elétricos no tratamento quimioterápico aumenta a sobrevida.

5.2 VOLUME DO TUMOR DOS GRUPOS 7 AO 16

Os resultados apresentados a seguir correspondem ao volume tumoral dos grupos 7 ao 16, referentes aos animais que foram eutanasiados três dias após o tratamento para a exérese do tumor e posterior análise imunoistoquímica.

Os grupos 7 a 9 representam os grupos dos animais que foram tratados uma vez. Obteve-se o volume tumoral no dia 0, referente ao dia do tratamento, e no dia 4, dia da eutanásia.

Na tabela 9 observa-se o volume tumoral dos animais do grupo 7, tratados com uma aplicação de eletroporação. Todos os animais apresentaram progressão do volume tumoral.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	145,55	200,90	84,47	232,86	116,41
4	735,43	2153,43	1076,45	1047,66	593,03

Tabela 9 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 7, tratados com uma aplicação de eletroporação, em função dos dias.

A tabela 10 apresenta resultados para os volumes tumorais dos animais do grupo 8, tratados com uma aplicação de Bleomicina. Observa-se progressão tumoral em todos os animais desse grupo.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	47,55	219,76	418,25	179,11	216,94
4	220,47	470,11	1301,05	442,36	835,64

Tabela 10 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 8, tratados com uma aplicação de Bleomicina, em função dos dias.

A tabela 11 apresenta o volume tumoral dos animais do grupo 9, tratados com uma aplicação de elequimioterapia. Observa-se diminuição do volume tumoral em 2 animais e progressão em 3 animais.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	76,33	49,50	93,11	194,32	85,73
4	119,11	25,39	57,97	428,38	266,46

Tabela 11 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 9, tratados com uma aplicação de eletroquimioterapia, em função dos dias.

Os animais dos grupos 10 ao 12 correspondem aos animais tratados duas vezes, com intervalo de três dias entre os tratamentos e eutanásia três dias após o último tratamento. Obteve-se o volume tumoral no dia 0, referente ao dia do primeiro tratamento, no dia 4, dia do segundo tratamento e no dia 8, dia da eutanásia.

Na tabela 12 observa-se o volume tumoral dos animais do grupo 10, tratado com duas aplicações de eletroporação. O volume tumoral de todos os animais desse grupo apresentou crescimento progressivo.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	155,88	109,34	57,77	167,70	263,89
4	500,56	519,80	331,93	346,69	2736,40
8	2423,75	1282,50	838,02	1221,96	3947,43

Tabela 12 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 10, tratados com duas aplicações de eletroporação, em função dos dias.

Os tumores dos animais do grupo 11, tratados com duas aplicações de Bleomicina, apresentaram crescimento progressivo a partir do dia do primeiro tratamento, os resultados estão representados na tabela 13.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	105,93	128,79	106,34	53,70	269,72
4	643,78	566,63	613,48	343,94	738,44
8	757,35	630,13	1399,39	1243,21	1197,27

Tabela 13 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 11, tratados com duas aplicações de Bleomicina, em função dos dias.

No grupo 12, animais tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia, observa-se diminuição do volume tumoral em todos os animais a partir do primeiro dia de aplicação, após o segundo dia de tratamento observamos em 3 dos 4 animais desse grupo regressão completa do tumor. O volume tumoral do grupo 12 está apresentado na tabela 14.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	138,25	46,19	64,50	55,51	94,61
4	92,08	86,58	0,00	37,47	64,12
8	137,17	20,51	0,00	0,00	0,00

Tabela 14 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 12, tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia, em função dos dias.

Os animais do grupo 13 ao 16 são os animais mantidos como controle dos grupos tratados.

A tabela 15 apresenta os resultados obtidos dos animais do grupo 13, controle referente ao grupo 7. Observa-se crescimento do volume tumoral em todos os animais desse grupo.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	135,90	87,17	225,07	454,10	80,75
4	701,32	875,89	816,95	851,37	387,91

Tabela 15 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 13, controle do grupo 7, em função dos dias.

Na tabela 16 observa-se os resultados dos animais do grupo 14, controle dos grupos 8 e 9. Um animal apresentou óbito antes do crescimento tumoral, nos demais animais desse grupo observamos crescimento tumoral.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	Óbito	120,70	163,78	380,09	75,58
4		433,10	749,90	3037,33	645,67

Tabela 16 - Volume tumoral dos 4 animais do grupo 14, controle dos grupos 8 e 9, em função dos dias.

Os resultados do volume tumoral dos animais do grupo 15, controle do grupo 10, estão representados na tabela 17. Observa-se aumento do volume tumoral progressivo em todos os animais.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	167,54	146,31	116,95	45,59	58,88
4	785,93	615,70	633,95	499,74	495,98
8	2551,14	1024,15	939,87	1256,09	936,00

Tabela 17 - Volume tumoral dos 5 animais do grupo 15, controle do grupo 10, em função dos dias.

Na tabela 18 estão os resultados do volume tumoral dos animais do grupo 16, controle dos grupos 11 e 12. Um animal desse grupo apresentou óbito antes do crescimento tumoral, nos demais animais observamos aumento progressivo do volume tumoral.

Dias	Volume do tumor (mm³)				
	A1	A2	A3	A4	A5
0	322,68	Óbito	93,74	122,04	113,97
4	845,20		306,83	399,80	363,46
8	2824,00		1176,68	1053,22	952,41

Tabela 18 - Volume tumoral dos 4 animais do grupo 16, controle dos grupos 11 e 12, em função dos dias.

5.2.1 Média do volume tumoral dos grupos tratados e controles

Foi realizada a comparação da média do volume tumoral entre cada grupo com seu respectivo controle. Entre os animais do grupo 7 (tratado com uma aplicação de eletroporação) e os animais do grupo 13 (controle) não foi observada diferença significativa nos dias 0 e 4. A tabela 19 apresenta os resultados desses grupos.

Dias	Grupo 7	Desvio padrão	Erro	Grupo 13	Desvio padrão	Erro	Valor p
0	156,04	60,66	27,13	196,60	155,08	69,35	0,6086
4	1121,20	612,52	273,93	726,69	200,85	89,82	0,2311

Tabela 19 - Média do volume tumoral dos grupos 7 e seu controle, grupo 13, com os erros da média e os testes estatísticos com seu valor p.

Na tabela 20 observa-se a média do volume tumoral dos animais do grupo 8 (tratados com uma aplicação de Bleomicina) e a média dos animais mantidos como controle desse grupo. Os resultados obtidos entre esses grupos não apresentaram diferença significativa.

Dias	Grupo 8	Desvio padrão	Erro	Grupo 14	Desvio padrão	Erro	Valor p
0	216,32	132,91	59,44	185,04	134,93	67,47	0,7388
4	653,92	423,74	189,50	1216,50	1221,02	610,51	0,4339

Tabela 20 - Média do volume tumoral dos grupos 8 e seu controle, grupo 14, com os erros da média e os testes estatísticos com seu valor p.

Os animais do grupo 9, tratados com uma aplicação de eletroquimioterapia, apresentaram média do volume tumoral menor que os animais do grupo controle no dia 4, mostrando uma resposta positiva ao tratamento. Esses resultados estão apresentados na tabela 21.

Dias	Grupo 9	Desvio padrão	Erro	Grupo 14	Desvio padrão	Erro	Valor p
0	99,80	55,36	24,76	185,04	134,93	67,47	0,8382
4	179,46	167,08	74,72	1216,50	1221,02	610,51	0,0021

Tabela 21 - Média do volume tumoral dos grupos 9 e seu controle, grupo 14, com os erros da média e os testes estatísticos com seu valor p.

Na tabela 22 e figura 28 são apresentados os resultados para os grupos 10 (tratado com duas aplicações de eletroporação) e o controle, não foi observada diferença entre os animais tratados e controles nos dias 0, 4 e 8.

Dias	Grupo 10	Desvio padrão	Erro	Grupo 15	Desvio padrão	Erro	Valor p
0	150,92	76,61	34,26	107,05	53,38	23,87	0,3278
4	887,08	1037,36	463,92	606,26	119,00	53,22	0,1942
8	1942,73	1267,48	566,83	1341,45	688,65	307,98	0,3863

Tabela 22 - Média do volume tumoral dos grupos 10 e seu controle, grupo 15, com os erros da média e os testes estatísticos com seu valor p.

Figura 28 - Média do volume tumoral dos grupos 10 (tratado com duas aplicações de eletroporação) e seu controle (grupo 15). As barras representam os erros da média.

Entre os animais dos grupos 11 (tratados com duas aplicações de Bleomicina) e controle não houve diferença na média do volume tumoral nos dias 0, 4 e 8 (tabela 23 e figura 29).

Dias	Grupo 11	Desvio padrão	Erro	Grupo 16	Desvio padrão	Erro	Valor p
0	132,90	81,31	36,36	163,11	107,05	53,52	0,6584
4	581,25	146,79	65,65	478,82	247,23	123,61	0,4994
8	1045,47	332,76	148,82	1501,58	886,37	443,19	0,3889

Tabela 23 - Média do volume tumoral dos grupos 11 e seu controle, grupo 16, com os erros da média e os testes estatísticos com seu valor p.

Figura 29 - Média do volume tumoral dos grupos 11 (tratado com duas aplicações de Bleomicina) e seu controle (grupo 16). As barras representam os erros da média (dispersão).

Na tabela 24 e figura 30 observamos os resultados entre os grupos 12 e 16. A média do volume tumoral dos animais do grupo 12, tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia, foi uma ordem de grandeza menor (9 e 48 vezes menor nos dias 4 e 8, respectivamente) que a média dos animais do grupo controle nos dias 4 e 8, indicando excelente resposta ao tratamento. Também observou-se substancial regressão tumoral nos animais tratados com apenas uma aplicação de eletroquimioterapia, em que a média do volume tumoral dos animais do grupo 9 foi 7 vezes menor no dia 4 (Tabela 21).

Dias	Grupo 12	Desvio padrão	Erro	Grupo 16	Desvio padrão	Erro	Valor p
0	79,81	37,38	16,72	163,11	107,05	53,52	0,2195
4	56,05	38,02	17,00	478,82	247,23	123,61	0,0405
8	31,54	59,72	26,71	1501,58	886,37	443,19	0,0449

Tabela 24 - Média do volume tumoral dos grupos 12 e seu controle, grupo 16, com os erros da média e os testes estatísticos com seu valor p.

Figura 30 - Média do volume tumoral dos grupos 12 (tratado com duas aplicações de eletroquimioterapia) e seu controle (grupo 16). As barras representam os erros da média.

Não foi observada diferença entre a média dos grupos tratados com eletroporação, Bleomicina e controle, tanto para uma aplicação quanto para duas aplicações; nesses animais houve progressão do volume tumoral.

Foi realizada uma comparação entre os animais do grupo 12 com os animais do grupo 5, também tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia, porém mantidos vivos após tratamento para acompanhar a sobrevida. Não houve diferença entre esses dois grupos, com valores de $p = 0,53$ no dia 4 e $p = 0,88$ no dia 8, indicando que ambos os grupos apresentaram a mesma resposta ao tratamento.

Observa-se nas figuras 31, 32 e 33 os animais dos grupos 10 e controle, 11 e controle e 12 e controle, respectivamente.

Figura 31 – Em A observa-se o animal 5 do grupo 10 no oitavo dia após tratamento com duas aplicações de eletroporação. Em B observa-se o animal 1 do grupo 15 (controle) no oitavo dia após tratamento.

Figura 32 - Em A observa-se o animal 3 do grupo 11 no oitavo dia após tratamento com duas aplicações de Bleomicina. Em B observa-se o animal 3 do grupo 16 (controle) no oitavo dia após tratamento.

Figura 33 - Em A observa-se o animal 1 do grupo 12 no oitavo dia após tratamento com duas aplicações de eletroquimioterapia. Em B observa-se o animal 1 do grupo 16 (controle) no oitavo dia após tratamento.

5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E NÚMERO DE MITOSES

O resultado da histologia tumoral foi semelhante em todos os grupos, variando apenas o número de mitoses de cada grupo. Sabe-se que em melanoma existe relação entre o número de mitoses e o prognóstico, quanto maior o número de mitoses observadas nesse tipo tumoral pior é o prognóstico (SPATZ et al., 2010). Com isso, optou-se por avaliar a contagem do número de mitoses nos animais. Todos os casos apresentavam neoplasia maligna, invadindo difusamente o tecido amostrado, caracterizada por proliferação de melanócitos de aspecto poliédrico ou alongado com núcleos amplos, alto pleomorfismo nuclear, citoplasma amplo, com variada quantidade de pigmento acastanhado. Estroma fibroso escasso e numerosas figuras de mitose, indicando que o tratamento não alterou a histologia tumoral. O tecido observado apresentou característica semelhante ao que já foi observado em melanoma B16F10. De acordo com Guzovsky (2011) observa-se tumores em proliferação expansiva, amplos citoplasmas e núcleos.

A coleta do tumor para análise histopatológica foi feita em períodos diferentes; nos animais dos grupos 1 ao 6 (animais mantidos para análise de sobrevivência) essa coleta foi realizada quando o tumor atingiu 20 mm em ambas as medidas, enquanto que nos animais dos grupos 7 ao 16 a coleta foi realizada 3 dias após o tratamento. Devido a isso, os resultados do número de mitoses serão divididos em duas partes: número de mitoses dos grupos 1 ao 6 (sobrevivência) e número de mitoses dos grupos 7 ao 16 (eutanasiados 3 dias após o tratamento). Realizou-se a contagem do número de mitoses em 10 campos com aumento de 40 vezes e posterior cálculo da média entre os animais de cada grupo.

5.3.1 Número de mitoses dos grupos 1 ao 6

O número de figuras de mitose medido nos grupos 1 ao 6 está na tabela 25. Não foi observada diferença significativa entre os animais dos grupos tratados com seus respectivos controles. Todas as análises realizadas com esses grupos foram feitas quando o tumor estava em fase de crescimento progressivo, momento da eutanásia, e os resultados obtidos são compatíveis com o esperado, uma vez que a histologia tumoral foi semelhante. Espera-se que na fase de progressão os tumores dos diferentes grupos apresentem o mesmo padrão mitótico.

Grupos	Média mitoses	Desvio Padrão
Grupo 1	27,33	5,03
Grupo 2	30	0
Grupo 3	34	20
Grupo 4	21	4,24
Grupo 5	45,3	16,17
Grupo 6	52	7,21

Tabela 25- Média do número de mitoses nos grupos 1 ao 6 e seus respectivos desvios padrão.

5.3.2 Número de mitoses dos grupos 7 ao 16

Os grupos 7 ao 12 correspondem aos animais que foram eutanasiados 3 dias após o tratamento e os grupos 13 ao 16 são seus controles. Comparou-se os resultados do número de mitoses entre os grupos tratados e seus respectivos controles.

Todos os tumores analisados apresentam grande número de mitoses; de fato, o melanoma B16F10 apresenta característica de malignidade acentuada, com alta e rápida capacidade desenvolvimento *in vivo* (JUNQUEIRA JUNIOR, 1996; JUNQUEIRA JUNIOR et al., 1997). A taxa de mitose é o segundo preditor mais poderoso de sobrevivência, com um potencial de afetar negativamente a sobrevivência mesmo em estados de doença com outros

fatores que influenciariam prognósticos favoráveis (DAVAR; TARHINI; KIRKWOOD, 2012).

No apêndice 1 encontram-se as médias de cada grupo analisado, seus respectivos controles e desvio padrão da média.

Na tabela 26 estão os resultados da média de mitoses contadas nos grupos 7 ao 16 e a avaliação de significância.

Observa-se que somente os grupos tratados com uma e duas aplicações de eletroquimioterapia apresentam média inferior ao controle. Pode-se afirmar que esse tratamento interferiu no número de mitoses observadas no tecido tumoral, reduzindo a taxa de mitoses e contribuindo para melhor prognóstico.

Os demais grupos apresentaram média de mitoses semelhantes aos controles; o que indica que o tratamento, com uma e duas aplicações de eletroporação e de Bleomicina, não interfere na quantidade de mitoses observadas no microambiente tumoral.

Uma das motivações desse trabalho foi de avaliar a relação entre os diferentes tratamentos e seus efeitos nos tumores; através do número de mitoses podemos estimar a resposta ao tratamento e a evolução tumoral. O aumento da taxa de mitose (definida como o número de mitoses por milímetro quadrado) marca uma lesão mais agressiva e está associada com pior sobrevida em cada categoria de tamanho tumoral (DAVAR; TARHINI; KIRKWOOD, 2012). Os resultados de sobrevida, observados nos animais tratados com eletroquimioterapia, foram muito maiores em comparação aos controles, esses grupos também apresentaram menor número de mitoses. Essa relação também foi observada com a taxa de remissão tumoral, os grupos que apresentaram maior remissão foram aqueles que tiveram menor número de mitoses.

Tratamento	Grupo / Controle	Média de mitoses	Avaliação
Uma aplicação de eletroporação	7 / 13	23 / 28	Sem diferença significativa
Uma aplicação de Bleomicina	8 / 14	27,3 / 30	Sem diferença significativa
Uma aplicação de eletroquimioterapia	9 / 14	21,67 / 30	Diferença significativa
Duas aplicações de eletroporação	10 / 15	33,67 / 40	Sem diferença significativa
Duas aplicações de Bleomicina	11 / 16	36,3 / 34,3	Sem diferença significativa
Duas aplicações de eletroquimioterapia	12 / 16	19,67 / 34,3	Fator 2 de diferença

Tabela 26 – Média de mitoses nos grupos tratados com uma e duas aplicações de eletroporação, Bleomicina e eletroquimioterapia comparada aos seus respectivos controles.

Os grupos tratados com uma e duas aplicações de eletroquimioterapia apresentaram menor número de mitoses comparados aos controles. Com isso, pode-se assumir a eficácia do tratamento, que reduziu o número de mitoses e confirmou a relação inversa entre o número de mitoses com o prognóstico e sobrevida; quanto maior o número de mitoses pior o prognóstico. A proliferação do melanoma, definida pela taxa de mitoses, é um preditor independente e poderoso de sobrevida (SPATZ et al., 2010).

5.4 IMUNOISTOQUÍMICA DOS GRUPOS 7 AO 16

O objetivo inicial da análise imunoistoquímica foi realizar marcação de microvasos com o anticorpo CD31 e Fator VIII para avaliar a angiogênese tumoral dos grupos 7 ao 16. Foi executado previamente um ensaio para esses marcadores e obtiveram marcação adequada. Com isso optou-se por usar anticorpo 1A4 para marcar microvasos e anticorpo Triptase para marcar mastócitos.

O anticorpo 1A4 é um marcador de actina de músculo liso, marca as células mioepiteliais com um padrão de membrana citoplasmática. Contudo, estes marcadores reagem de forma cruzada com miofibroblastos e células musculares lisas de vasos (WERLING et al., 2003).

Os resultados obtidos com a média da contagem de microvasos marcados com anticorpo 1A4 são apresentados na tabela 27. Não foi observada diferença significativa entre os animais dos grupos 7, 8, 9, 10, 11 e 12 com seus respectivos controles. Estudos que avaliaram a ocorrência de hipóxia após o tratamento com eletroquimioterapia revelaram um pico de hipóxia de 2 a 8 horas após o tratamento, a área hipóxica começou a diminuir 14 horas após tratamento e a recuperação total não ocorreu antes de 24 horas após tratamento. A hipóxia no tumor pode ocorrer como resultado de uma oferta insuficiente de oxigênio por via sanguínea, por diminuição do número de vasos ou por vasos mal formados (COR et al., 2009). Em outro estudo no qual foram avaliados o fluxo sanguíneo por *Doppler* e hipóxia por imunoistoquímica observa-se que a aplicação de pulsos elétricos nos tumores induziu redução do fluxo sanguíneo, essa redução foi transitória e recuperada em 24 horas. Durante a redução do fluxo de sangue foi observado o aumento da área de hipóxia no tumor para até 30% (SERSA et al., 2008b). O estudo atual não apresentou diferença na contagem de microvasos sugerindo que após 3 dias de tratamento a vascularização tumoral estava recuperada.

Grupos	Média de microvasos	Desvio padrão	Valor p
Grupo 7	11,4	6,7305	0,4153
Grupo 8	11	4,6368	0,2618
Grupo 9	9	3,3912	0,6308
Grupo 10	9,2	4,1473	0,5524
Grupo 11	12,4	3,2094	0,6846
Grupo 12	14,8	3,4205	0,4511
Grupo 13	14,6	4,8270	
Grupo 14	8	2,9155	
Grupo 15	7,4	4,9800	
Grupo 16	13,2	2,7749	

Tabela 27 - Resultado da média de microvasos feita através da identificação de microvasos marcados pelo anticorpo 1A4, em que foi realizada a contagem de 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10mm, desvio padrão da média e teste *T-Student* entre os grupos tratados e seus respectivos controles.

A média de mastócitos foi feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase. Os mastócitos no microambiente tumoral contribuem para a carcinogênese e metástases, participam no desenvolvimento e propagação de tumores cutâneos através de aumento da angiogênese, perturbações da matriz extracelular e promoção de mitose de células tumorais. Possuem amplos efeitos, por vezes, opostos no desenvolvimento tumoral (CH'NG et al., 2006).

Na tabela 28 estão os resultados da média de mastócitos dos animais dos grupos 7 (tratados com uma aplicação de eletroporação) e seu controle (grupo 13), não foi observada diferença entre esses grupos, indicando que um tratamento de eletroporação não alterou o número de mastócitos.

Grupos	Média de mastócitos	Desvio padrão	Valor p
7	2,8	1,9235	0,686
13	3,2	0,8367	

Tabela 28 - Resultado da média de mastócitos feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase, onde realizou-se a contagem das células positivas em 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10mm, desvio padrão da média e teste *T-Student* entre os grupos 7 (uma aplicação de eletroporação) e seu controle (grupo 13).

Observa-se na tabela 29 os resultados da média de mastócitos dos animais dos grupos 8 e controle. Não foi observada diferença entre as médias dos animais tratados com uma aplicação de Bleomicina e seu controle. O tratamento não alterou o número de mastócitos no microambiente tumoral.

Grupos	Média de mastócitos	Desvio padrão	Valor p
8	2,2	0,8367	0,258
14	3,4	1,9494	

Tabela 29 - Resultado da média de mastócitos feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase, onde realizou-se a contagem das células positivas em 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10mm, desvio padrão da média e teste *T-Student* entre os grupos 8 (uma aplicação de Bleomicina) e seu controle (grupo 14).

Entre os animais tratados com uma aplicação de eletroquimioterapia (grupo 9) e seu controle (grupo 14) não foi observada diferença na média de mastócitos (tabela 30), indicando que uma aplicação de eletroquimioterapia não interferiu no número de mastócitos no tumor.

Grupos	Média de mastócitos	Desvio padrão	Valor p
9	2,2	0,8367	0,258
14	3,4	1,9494	

Tabela 30 - Resultado da média de mastócitos feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase, onde realizou-se a contagem das células positivas em 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10mm, desvio padrão da média e teste *T-Student* entre os grupos 9 (uma aplicação de eletroquimioterapia) e seu controle (grupo 14).

Na tabela 31 observa-se os resultados dos grupos 10 (tratado com duas aplicações de eletroporação) e seu controle (grupo 15). A média de mastócitos no grupo tratado foi menor comparativamente ao controle. Sugere-se que duas aplicações de eletroporação diminuiu o número de mastócitos, interferindo no microambiente tumoral.

Grupos	Média de mastócitos	Desvio padrão	Valor p
10	0,8	0,8367	0,004
15	4,2	1,4832	

Tabela 31 - Resultado da média de mastócitos feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase, onde realizou-se a contagem das células positivas em 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10mm, desvio padrão da média e teste *T-Student* entre os grupos 10 (duas aplicações de eletroporação) e seu controle (grupo 15).

Não foi observada diferença entre o número de mastócitos dos animais do grupo 11 (duas aplicações de Bleomicina) e seu controle (grupo 16), o tratamento não interferiu no número de mastócitos (tabela 32).

Grupos	Média de mastócitos	Desvio padrão	Valor p
11	1,6	1,1402	0,077
16	3,6	1,8166	

Tabela 32 - Resultado da média de mastócitos feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase, onde realizou-se a contagem das células positivas em 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10mm, desvio padrão da média e teste *T-Student* entre os grupos 11 (duas aplicações de Bleomicina) e seu controle (grupo 16).

Observa-se na tabela 33 os resultados obtidos com os animais dos grupos 12 (tratado com duas aplicações de eletroquimioterapia) e o grupo 16 (controle). O número de mastócitos no grupo tratado foi menor que seu controle, indicando que o tratamento com duas aplicações de eletroquimioterapia diminuiu o número de mastócitos.

Grupos	Média de mastócitos	Desvio padrão	Valor p
12	0,8	1,0954	0,023
16	3,6	1,8166	

Tabela 33 - Resultado da média de mastócitos feita através da identificação de mastócitos marcados pelo anticorpo Triptase, onde realizou-se a contagem das células positivas em 5 campos de 400x por lâmina, com retículo de 10 x 10mm, desvio padrão da média e teste *T-Student* entre os grupos 12 (duas aplicações de eletroquimioterapia) e seu controle (grupo 16).

Observa-se diferença significativa no grupo 10, tratado com duas aplicações de eletroporação, quando comparado ao seu controle (grupo 15) e no grupo 12, tratado com 2 aplicações de eletroquimioterapia e seu controle (grupo 16); sugere-se com isso, que duas aplicações de eletroporação com intervalo de três dias interfere no número de mastócitos no microambiente tumoral. Sabe-se que melanomas com pobre prognóstico apresentam maior quantidade de mastócitos (RIBATTI et al., 2003). No ambiente tumoral os mastócitos são recrutados para reorganizar a arquitetura do estroma e ativar em excesso a neovascularização (COUSSENS et al., 1999).

Nos animais tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia observa-se diminuição do número de mastócitos e aumento de sobrevida, porém outros fatores associados podem ter contribuído para o aumento da sobrevida, já que essa relação entre número de mastócitos e sobrevida não foi observada no grupo tratado com duas aplicações de

eletroporação. O que indica que neste caso a redução do número de mastócitos não interferiu diretamente e individualmente na sobrevida dos animais.

5.5 INTERCOMPARAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS

A média do volume tumoral dos animais do grupo 12, tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia, foi uma ordem de grandeza menor (9 e 48 vezes menor nos dias 4 e 8, respectivamente) que a média dos animais do grupo controle nos dias 4 e 8, indicando excelente resposta ao tratamento.

O crescimento tumoral em animais do grupo tratado com apenas uma aplicação de eletroquimioterapia foi atenuado; de 3 a 4 vezes menor e maior sobrevida que os grupos controles.

Observa-se ocorrência de crescimento tumoral contínuo mesmo com a maior sobrevida do grupo tratado com uma aplicação de eletroquimioterapia, comparativamente aos demais grupos. Também, não houve remissão completa ou parcial do tumor, apesar de se observar um crescimento mais lento.

Observou-se remissão completa do volume tumoral em 60% dos animais e remissão parcial nos animais tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia. Essa remissão permaneceu por 12 dias pós tratamento. Esses animais apresentaram sobrevida 4 vezes maior que os animais controle.

O tratamento com uma e duas aplicações de eletroporação e de Bleomicina não interferiu no número de mitoses nos animais dos grupos 7 ao 16. Observou-se diferença entre o número de mitoses nos grupos 9 e 12, tratados com uma e duas aplicações de eletroquimioterapia, respectivamente. Esses grupos apresentaram menor número de mitoses comparativamente aos seus controles, indicando melhor prognóstico com esse tratamento. Os animais dos grupos de sobrevida (1 ao 6) apresentaram diferenças no número de mitoses, no momento da análise os tumores estavam em crescimento progressivo.

A contagem de microvasos 3 dias após o tratamento foi semelhante para os diferentes tratamentos, indicando que após esse período a neovascularização já estava restabelecida. Nos grupos tratados com duas aplicações de eletroporação e eletroquimioterapia observou-se menor número de mastócitos, o que podemos concluir que a aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem diminuiu o número dessas células no microambiente tumoral.

Observa-se maior sobrevida, menor número de mitoses e menor número de mastócitos nos animais tratados com duas aplicações de eletroquimioterapia, sugere-se com isso que o tratamento com duas aplicações de eletroquimioterapia modifica o microambiente tumoral em favor do controle tumoral obtendo-se com isso um melhor prognóstico.

Observou-se que os tratamentos com uma e duas aplicações de eletroporação não controlou o crescimento tumoral, sem diferir dos grupos controles. Este resultado condiz com o esperado; confirmando que a amplitude e duração dos pulsos foi adequada, não ocasionando morte celular. A aplicação de pulsos elétricos induz a formação de poros reversíveis na membrana, o que mantém a viabilidade da célula após a aplicação. Essa formação de poros somente será irreversível quando os valores de amplitude e duração dos pulsos excedem os padrões suportáveis pela membrana; desencadeando a morte celular (KRAMAR; MIKLAVCIC; MACEK LEBAR, 2007; PUC et al., 2004).

Os tratamentos com uma e duas aplicações de Bleomicina foram ineficientes no controle do crescimento tumoral. Sabe-se que a Bleomicina é uma droga com alto poder citotóxico intrínseco, porém apresenta característica de ser pouco permeável à membrana celular; o transporte dessa droga para dentro das células é realizado por endocitose mediada por proteínas carreadoras, depende diretamente da quantidade dessas proteínas expressas na membrana e da velocidade da endocitose (MIR; ORLOWSKI, 1999).

O objetivo de utilizar a eletroporação com o intuito de gerar poros na membrana celular e facilitar a entrada da Bleomicina nas células foi alcançado. Obteve-se excelente eficácia na associação dos dois tratamentos: eletroporação com 8 pulsos de 1000V e 100 μ s; e Bleomicina. O que revela que os poros foram formados e que ocorreu o transporte da Bleomicina através da membrana que antes era impermeável. Observa-se também que duas aplicações de eletroquimioterapia, com intervalo de 3 dias, contribui de forma significativa no controle da evolução do melanoma. Resultando em maior regressão tumoral e sobrevida.

A técnica para a aplicação de eletroquimioterapia desenvolvida neste estudo, na qual foi realizada duas aplicações de eletroquimioterapia com intervalo de três dias revelou-se mais eficaz que apenas uma aplicação no controle do melanoma; mesmo este sendo potencialmente agressivo. Aplicações seriadas dessa técnica pode ser uma perspectiva futura para o tratamento de tumores sólidos que apresentam pouca resposta aos tratamentos quimioterápicos convencionais.

6 CONCLUSÕES

O aparelho eletroporador desenvolvido pelo grupo apresentou as características necessárias ao objetivo proposto. Facilitou a entrada da bleomicina nas células, o que resultou em uma excelente resposta no controle do desenvolvimento tumoral.

A eficiência de aplicações seriadas de eletroquimioterapia observada em melanoma revela uma ótima proposta de terapia em tumores sólidos com alto grau de malignidade.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. A. F.; DeMELLO, E. S.; LONGATO FILHO, A. Noções Básicas de Patologia e Imunoistoquímica. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 9 – 20.
- BELFORT, F. A.; SCHMERLING, R. A. Melanoma Cutâneo. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 2367 – 2383.
- BICEK, A. et al. Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells in vitro. **Bioelectrochem.**, v. 71, n. 2, p. 113-117, 2007.
- BUZAID, A. Z.; MURREN, J. Chemotherapy for advanced malignant melanoma. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 21, p. 205-209, 1992.
- BYRNE, C. M. et al. Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). **Melanoma Res.**, v. 15, n. 1, p. 45 – 51, 2005.
- CAMPOS, V. E. B. Estudo da potencialidade de ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli-ε-caprolactona para uso na eletroterapia do câncer. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- CEMAZAR, M. et al. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 22, p. 826 – 831, 2008.
- CHAMMAS, R. Biologia do cancer: uma breve introdução. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 3 – 7.
- CHIN, L.; MERLINO, G.; DEPINHO, R. A. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. **Gene. Dev.**, v. 12, p. 3467-3481, 1998.
- CH'NG, S. et al. Mast cells and cutaneous malignancies. **Modern Pathol.**, v. 19, p. 149–159, 2006.
- COR, A. et al. Comparison between hypoxic markers pimonidazole and glucose transporter 1 (Glut-1) in murine fibrosarcoma tumours after electrochemotherapy. **Radiol. Oncol.**, v. 43, n. 3, p. 195-202, 2009.
- COROVIC, S.; ZUPANIC, A.; MIKLAVCIC, D. Numerical modeling and optimization of electric field distribution in subcutaneous tumor treated with electrochemotherapy using needle electrodes. **Ieee T. Plasma Sci.**, v. 36, n. 4, p. 1665 – 1672, 2008.

COUSSENS, L. M. et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1382-1397, 1999.

DALECK, C. R.; DeNARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Rocca, 2008. 612 p.

DAVAR, D.; TARHINI, A.; KIRKWOOD, J. M. Adjuvant therapy: melanoma. **Cancer J.**, v. 18, n. 2, p. 192–202, 2012.

DIAS, S. J. R.; CAIADO, F. Vasculogênese na Angiogênese. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 395 – 402.

DOMENGE, C. et al. Antitumor Electrochemotherapy: New Advances in the Clinical Protocol. **Cancer**, v. 77, n. 5, p. 956 – 963, 1996.

DOSS, L. L.; MEMULA, N. The radioresponsiveness of melanoma. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 8, p. 1131-1134, 1982.

ENTIN, I. et al. Tumor Growth Retardation, Cure, and Induction of Antitumor Immunity in B16 Melanoma-bearing Mice by Low Electric Field-enhanced Chemotherapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 3190-3197, 2003.

GARBE, C. et al. Treatment of Melanoma. **Dtsch Arztebl.**, v. 105, n. 49, p. 845–851, 2008.

GOTHELF, A.; MIR, L. M.; GEHL, J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. **Cancer Treat. Rev.**, v. 29, n. 5, p. 371-387, 2003.

GOWRISHANKAR, T. R.; WEAVER, J. C. Electrical behavior and pore accumulation in a multicellular model for conventional and supra-electroporation. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 349, n. 2, p. 643 – 653, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

GUZOVSKY, E. M. Análise de alterações histopatológicas e celulares em tecidos de camundongos C57BL/6J inoculados com células de melanoma experimental B16F10 por via subcutânea e tratados com o imunomodulador Imiquimod 5%. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n. 5, p. 646 – 674, 2011.

HELLER, R. et al. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. **Cancer**, v. 77, n. 5, p. 964-971, 1996a.

HELLER, R. et al. In vivo gene electro- injection and expression in rat liver. **FEBS Lett.**, v. 389, n.3, 225-228, 1996b.

HELLER, R. et al. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. **Cancer**, v. 83, n. 1, p. 148-157, 1998.

HENRY, C. J.; HIGGINBOTHAM, M. L. **Cancer management in small animal practice**. Missouri: Saunders Elsevier, 2010, 403 p.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Pele Melanoma. São Paulo. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao>. Acesso em: 10 set 2014.

JAROSZESKI, M. J. *et al.* Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. **Anti-cancer Drug**, v. 11, n. 3, p. 201-208, 2000.

JONES, T.C ; HUNT, R.D. ; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415 p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

JUNQUEIRA JUNIOR, G. Tamoxifeno no tratamento do melanoma murinho B16F10 em camundongos C57BL/6N. 1996. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

JUNQUEIRA JUNIOR, G. et al. Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 72, p. 487-489, 1997.

KANDUSER, M.; SENTJURC, M.; MIKLAVCIC, D. Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing. **Eur. Biophys. J.**, v. 35, p. 196 – 204, 2006.

KRAMAR, P.; MIKLAVCIC, D.; MACEK LEBAR, A. Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 1, p. 23 – 27, 2007.

LANORE, D.; DULPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. 228 p.

LEBOIT, P. E.; BURG, G.; WEEDON, D.; SARASAIN, A. (Eds.). **World Health Organization Classification of Tumours**. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC, 2006.

LODISH, H. *et al.* **Molecular cell biology**. 6. ed. Nova York: Palgrave Macmillan, 2008, 970 p.

MENÉNDEZ, P. R. *et al.* BNCT for skin melanoma in extremities: Updated Argentine clinical results. **Appl. Radiat. Isotopes**, v. 67, n. 7, p. S50-S53, 2009.

MIKLAVCIC, D. *et al.* The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. **Biophys. J.**, v. 74, n. 5, p. 2152-2158, 1998.

MIR, L. M. *et al.* First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. **Br. J. Cancer.**, v. 76, n. 12, p. 1617-1622, 1997.

MIR, L. M. *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. **Br. J. Cancer**, v. 77, n.12, p. 2336-2342, 1998.

MIR, L. M.; ORLOWSKI, S. Mechanisms of electrochemotherapy. **Adv. Drug Deliver Ver.**, v. 35, n. 1, p. 107 – 118, 1999.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Oncologia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2007, 300 p.

OKUNO, E. *et al.* **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1982, 490 p.

ORLOWSKI, S.; MIR, L. M. Cell electroporation: a new tool for biochemical and pharmacological studies. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1154, n. 1, p. 51-63, 1993.

PUC, M. *et al.* Techniques of signal generation required for electroporation. Survey of electroporation devices. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 113 – 124, 2004.

RANGEL, M. M. M. Interferência da eletroporação sobre a expressão de conexinas. 2011. 121 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Departamento de Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.

RIBATTI, D. *et al.* Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 33, p. 420-425, 2003.

SALDIVA, P. H. N. Câncer e Meio Ambiente. In: HOFF, P. M. G. *et al.* **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 111 – 118.

SATKAUSKAS, S. et al. Effectiveness of tumor electrochemotherapy as a function of electric pulse strength and duration. **Bioelectrochemistry**, v. 65, n. 2, p. 105-111, 2005.

SERSA, G. et al. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. **Bioelectroch. Bioener.**, v. 35, p. 23-27, 1994.

SERSA, G. et al. Tumour Blood Flow Changes Induced by Application of Electric Pulses. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 4, p. 672-677, 1999.

SERSA, G. et al. Electrochemotherapy in treatment of tumours. **EJSO-Eur. J. Surg. Onc.**, v. 34, p. 232-240, 2008a.

SERSA, G. et al. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. **Br. J. Cancer**, v. 98, p. 388-98, 2008b.

SNOJ, M. et al. Effective treatment of multiple unresectable skin melanoma metastases by electrochemotherapy. **Croat. Med. J.**, v. 48, n. 3, p. 391-395, 2007.

SOLTYS, D. T. et al. Instabilidade Genômica, Reparos de DNA e Câncer. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. 2 v. p. 169 – 184.

SOUSA, R. B.; CUNHA, F. Q. Inflamação e Câncer. In: HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. 2 v. p. 431 – 446.

SPATZ, A. et al. The biology of melanoma prognostic factors. **Discov. Med.**, v. 10, n. 50, p. 87-93, 2010.

STAQUICINI, F. I. et al. Enzyme and integrin expression by high and low metastatic melanoma cell lines. **Melanoma Res.**, v. 13, n. 1, p. 11-18, 2003.

STEEL, G. G. **Growth kinetics of tumor** – cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Oxford: Claredon, 1977, 351 p.

TAKANO, D. M.; ABREU E LIMA, M. C. Estudo de distribuição e morfologia dos melanócitos em pele com e sem exposição solar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.46, n.1, p. 29-36, 2010.

TESTORI, A. et al. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. **Ann. Oncol.**, v. 20, n. 6, p. vi22–vi29, 2009.

TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes. **Biophys. J.**, v. 60, p. 297-306, 1991.

VONGTAMA, R. et al. Efficacy of radiation therapy in the local control of desmoplastic malignant melanoma. **Head Neck.**, v. 25, n. 6, p. 423-428, 2003.

VRIES, E.; COEBERGH, J.W. Cutaneous malignant melanoma in Europe. **Eur. J. Cancer**, v. 40 n.16, p. 2355-2366, 2004.

WERLING, R. W. et al. Immunohistochemical distinction of invasive from non-invasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 27, n.1, p. 82-90, 2003.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4 ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2007, 846 p.

APÊNDICE

Observa-se na tabela 1 o número de mitoses contados nos animais do grupo 7 e seu controle (grupo 13). Não foi observada diferença significativa entre esses grupos, revelando que não houve diferença na média de mitoses entre o tratamento com uma aplicação de eletroporação e o controle.

Grupos	Número de mitoses	Desvio padrão	Valor p
7	23	7,55	0,424
13	28	6,08	

Tabela 34 - Média do número de mitoses nos grupos 7 e seu controle, desvio padrão e teste *T-Student*. Valores de $p > 0,05$ diferença não significativa.

Na tabela 2 observa-se o número de mitoses dos animais do grupo 8, tratados com uma aplicação de Bleomicina e seu controle (grupo 14). Não foi observada diferença significativa entre esses grupos, com valor $p = 0,731$.

Grupos	Número de mitoses	Desvio padrão	Valor p
8	27,3	11,5	0,731
14	30	3	

Tabela 35 - Média do número de mitoses nos grupos 8 e seu controle, desvio padrão e teste *T-Student*. Valores de $p > 0,05$ diferença não significativa.

O número de mitoses observado nos animais do grupo 9, tratados com uma aplicação de eletroquimioterapia e eutanasiados 3 dias após o tratamento, foi significativamente menor que seu controle, com $p = 0,037$ (tabela 3). Observa-se influência do tratamento no número de mitoses.

Grupos	Número de mitoses	Desvio padrão	Valor p
9	21,67	3,51	0,037
14	30	3	

Tabela 36 - Média do número de mitoses nos grupos 9 e seu controle, desvio padrão e teste *T-Student*. Valores de $p < 0,05$ diferença significativa.

Na tabela 4 observa-se o número de mitoses nos animais do grupo 10 (tratados com duas aplicações de eletroporação) e seu controle (grupo 15). Não foi observada diferença entre esses grupos, indicando que o tratamento não interferiu no número de mitoses.

Grupos	Número de mitoses	Desvio padrão	Valor p
10	33,67	16,77	0,627
15	40	12,16	

Tabela 37 - Média do número de mitoses nos grupos 10 e seu controle, desvio padrão e teste *T-Student*. Valores de $p > 0,05$ diferença não significativa.

O número de mitoses dos grupos 11 e seu controle estão na tabela 5. Não foi observada diferença significativa entre esses grupos, conclui-se que o tratamento com 2 aplicações de Bleomicina não interferiu no número de mitoses.

Grupos	Número de mitoses	Desvio padrão	Valor p
11	36,3	16,17	0,857
16	34,3	6,66	

Tabela 38 - Média do número de mitoses nos grupos 11 e seu controle, desvio padrão e teste *T-Student*. Valores de $p > 0,05$ diferença não significativa.

Observa-se na tabela 6 que os animais do grupo 12 (tratados com 2 aplicações de eletroquimioterapia) apresentaram menor número de mitoses comparativamente ao controle, com valor $p = 0,044$, indicando que esse tratamento interferiu no número de mitoses do microambiente tumoral.

Grupos	Número de mitoses	Desvio padrão	Valor p
12	19,67	3,21	0,044
16	34,3	6,66	

Tabela 39 - Média do número de mitoses nos grupos 12 e seu controle, desvio padrão e teste *T-Student*. Valores de $p < 0,05$ diferença significativa.